

Aus der Klinik für Strahlentherapie des Zentrums für Radiologie
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg und Gießen

**Prüfung der HIF-1alpha induzierten
Strahlenresistenzhöhung bei humanen
Adenokarzinomzellen der Lunge im Xenograftmodell**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Steffen Grund aus Dortmund
Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 26.3.12 (Tag der Disputation).

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic
1. Korreferent:	Prof. Dr. C. Vogelmeier

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	8
1.1.	Das Bronchialkarzinom	8
1.1.1.	Epidemiologie und Ätiologie	8
1.1.2.	Histologische Klassifikation	9
1.1.3.	Stadieneinteilung	9
1.1.4.	Bedeutung der Strahlentherapie bei der Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms	10
1.2.	Einfluss von Hypoxie auf die Wirkung von Strahlung und Induktion von Veränderungen im Zellverhalten	12
1.3.	Hypoxie-induzierbare Faktoren HIF-1alpha und HIF-2alpha: Bestrahlungseffekte und die Möglichkeit der Inhibition	13
1.3.1.	Bestrahlungseffekte auf die HIF-1alpha-Aktivität	16
1.3.2.	Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) über small interfering RNA (siRNA)	17
1.4.	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	18
2.	MATERIALIEN UND METHODIK	21
2.1.	Zellkultur	21
2.1.1.	Humane Adenokarzinomzellen A549	21
2.1.2.	Zellkulturmedium	21
2.1.3.	Auftauen und Kultivierung der Zellen	22
2.1.4.	Zellvorbereitung für <i>in vivo</i> Experimente	22
2.1.5.	Einfrieren und Langzeitlagerung der Zellen	23
2.2.	siRNA	23
2.2.1.	Auswahl und Aufbereitung der siRNAs	23
2.2.2.	Herstellung der Transfektionsmischung	24
2.2.3.	Injektion der siRNAs	24
2.3.	<i>In vivo</i> Versuche	25

2.3.1.	Versuchstiere	25
2.3.2.	Narkose der Versuchstiere	25
2.3.3.	Subkutane Injektion der Tumorzellen	26
2.3.4.	Messung des Tumolvolumens	26
2.3.5.	Experimenteller Aufbau der Bestrahlungsversuche	26
2.3.6.	MRT-Perfusionsmessung der subkutan gelegenen A549-Tumoren bei CD1 nu/nu Mäusen	28
2.3.7.	Präparation der Tumoren nach Versuchsabschluss	28
2.4.	Allgemeiner Versuchsaufbau	29
2.4.1.	Bestrahlungseffekte auf das Tumolvolumen von subkutan implantierten A549-Tumoren im Xenograftmodell	29
2.4.2.	Effekt einer alleinigen Bestrahlung oder einer spezifischen Inhibition der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1alpha und HIF-2alpha mit siRNA oder der Kombination beider Verfahren	29
2.4.3.	Rechnerische Ermittlung der Wachstumsverzögerung	31
2.5.	Histologische Untersuchungen	32
2.5.1.	Anfertigung von Gefrierschnitten	32
2.5.2.	Färbung	33
2.5.2.1.	Nachweis von Angiogenese in A549-Tumoren nach einer Bestrahlung	33
2.5.2.2.	Nachweis von Proliferation in A549-Tumoren nach einer Bestrahlung	34
2.5.2.3.	Nachweis von Apoptose in A549-Tumoren nach einer Bestrahlung	35
2.6.	Mikroskopische Auswertung	35
2.7.	Statistische Auswertung	36
3.	ERGEBNISSE	37
3.1.	Effekt einer perkutanen Photonenbestrahlung auf subkutan implantierte A549-Tumoren im Xenograftmodell	37
3.1.1.	Nachweis des Bestrahlungseffektes	37
3.1.2.	Histologische Untersuchungen nach Bestrahlung von A549-Tumoren mit 1 x 2,0 Gy oder 6 x 1,8 Gy	40
3.1.2.1.	Untersuchung der Auswirkung der Bestrahlung auf das Tumorgewebe	40

3.1.2.2.	Apoptoserate in A549-Tumoren nach Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy oder 6 x 1,8 Gy	44
3.1.2.3.	Angiogeneserate in A549-Tumoren nach Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy oder 6 x 1,8 Gy	46
3.1.2.4.	Proliferationsrate in A549-Tumoren nach Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy oder 6 x 1,8 Gy	48
3.2.	MRT-Perfusionsdarstellung von subkutan transplantierten A549-Tumoren	50
3.3.	Differenzierung des Effekts einer alleinigen Bestrahlung, einer Inhibition der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1alpha oder HIF-2alpha oder deren Kombination	52
3.3.1.	Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren durch alleinige Bestrahlung	52
3.3.2.	Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren unter alleiniger siRNA-Injektion gegen HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha	55
3.3.3.	Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren durch die Kombination einer Bestrahlung mit einer siRNA-Injektion	59
4.	DISKUSSION	65
4.1.	Prüfung des Bestrahlungseffektes auf A549-Tumoren im Xenograftmodell	65
4.1.1.	Zellapplikation und Bestrahlungsparameter	65
4.1.2.	Dosiseffekt	66
4.1.3.	Untersuchung der Tumorperfusion durch MRT	68
4.2.	Prüfung des Bestrahlungseffekts nach Inhibition von HIF mittels siRNA auf A549-Tumoren im Xenograftmodell	69
4.2.1.	Wachstumsverzögerung	69
4.2.2.	Suppression von HIF-1alpha reduziert die Strahlenresistenz im A549-Xenograftmodell	71
4.2.3.	HIF-2alpha ohne Einfluss auf die Strahlenresistenz	75
5.	ZUSAMMENFASSUNG	77
6.	SUMMARY	79
7.	ANHANG	81
7.1.	Literaturverzeichnis	81

7.2.	Abbildungsverzeichnis	88
7.3.	Tabellenverzeichnis	90
7.4.	Abkürzungsverzeichnis	91
7.5.	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	93
8.	CURRICULUM VITAE	96
9.	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	98
10.	DANKSAGUNG	99
11.	ERKLÄRUNG	100

1. Einleitung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im Zeitraum vom Dezember 2005 bis Dezember 2007 an der Klinik für Strahlentherapie (Direktorin: Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic) des Zentrums für Radiologie der Philipps-Universität Marburg sowie an der Medizinischen Klinik II und Poliklinik des Zentrums für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. F. Rose (Marburg) angefertigt und durch Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic betreut. In der Arbeitsgruppe wurden unter anderem Untersuchungen zu Resistenzen von Lungentumoren gegenüber Photonenstrahlung durchgeführt.

Hypoxie ist ein allgemeines Charakteristikum von soliden Tumoren. Diese ist durch Anpassung der Tumorbiologie an das bestehende Mikromilieu mit Therapieresistenz [96] [88] und dadurch mit einer schlechteren Prognose [4] [89] assoziiert.

1.1. Das Bronchialkarzinom

Bronchialkarzinome sind maligne Neubildungen der Lunge, die sowohl vom Oberflächenepithel des Bronchialsystems als auch vom diffusen neuroendokrinen System abstammen können. Abhängig von der Tumorausbreitung bei Erstdiagnose und ggf. Progression der Erkrankung liegt die mittlere Überlebenszeit der Patienten nur bei ein bis zwei Jahren [72] [35] [6].

1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 33.000 Neuerkrankungen erreichen maligne Neuerkrankungen der Lunge bei beiden Geschlechtern den dritten Rang der jährlichen Krebsinzidenz in Deutschland [6]. Somit ist die Behandlung maligner Neuerkrankungen der Lunge ein klinisch sehr relevantes Problem.

Der wichtigste Risikofaktor ist das Rauchen [5] [46] durch Einatmen hochwirksamer Karzinogene wie Benzpyrene, Nitrosamine, Beta-Naphthylamine, Hydrazine und Polonium. Der Anstieg der Lungenkrebserkrankungen im letzten Jahrhundert ist auch auf industrielle Faktoren durch Exposition gegenüber Asbest, Silikaten, Arsen, Chrom- und Nickeldämpfen [3] [40] zurückzuführen. Zudem spielen intrinsische Faktoren, wie z. B. Vererbung, eine Rolle [64] [47].

1.1.2. Histologische Klassifikation

Bronchialkarzinome können vom Epithel, lymphatischen Gewebe, Mesothel- oder Mischgewebe ausgehen. Sie werden in small oder non-small cell lung cancer eingeteilt. Small cell lung cancer (SCLC) kommt zu etwa 20% vor. Dieser Typ hat eine hohe Proliferationsrate und zeigt eine hohe Tendenz zur Fernmetastasierung [7] [85]. Non-small cell lung cancer (NSCLC) kommt zu etwa 75 - 80% vor. Dieser Bronchialkarzinomtyp wird in vier Unterklassen eingeteilt [7] [85]. **Plattenepithelkarzinome** stellen mit 35 - 40% die häufigste Unterklasse der NSCLC dar [86]. **Großzellige Lungenkarzinome** machen einen Anteil von etwa 10% an der Gesamtzahl der NSCLC aus [86]. **Adenosquamöse** Karzinome stellen ca. 4% der Gesamtzahl der NSCLC [86]. Das **Adenokarzinom** der Lunge, das in der vorgelegten Arbeit untersucht wurde, ist der häufigste Tumortyp bei Nichtrauchern und stellt einen Anteil von 30 - 35% aller NSCLC dar. Adenokarzinome sind bevorzugt in der Lungenperipherie angesiedelt und haben eine charakteristische alveoläre Ausbreitung [86]. Schon frühzeitig zeigen diese Tumoren eine ausgeprägte Neigung zur Gefäßinvasion und haben durch eine häufige hämatogene Metastasierung eine schlechte Prognose.

1.1.3. Stadieneinteilung

Neben der histologischen Klassifikation ist für die Prognose die Tumorausbreitung ausschlaggebend. Die Prognose eines Lungentumors ist eng mit der Größe des Tumors und der sich daraus ergebenden Metastasierungswahrscheinlichkeit assoziiert [29]. Die Tumorausbreitung wird mittels des TNM-Systems erfasst. Ziel der genauen Ausbreitungsdiagnostik ist

die Planung einer stadiengerechten, risikoadaptierten Therapie, da je nach Ausbreitung des Tumors der Benefit einzelner Therapiekomponenten unterschiedlich stark ist.

1.1.4. Bedeutung der Strahlentherapie bei der Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms

Die Strahlentherapie gehört neben der operativen Tumorresektion und der Chemotherapie zu den drei Säulen der Therapie des Bronchialkarzinoms. Die Wahl des Therapieregimes ist abhängig vom Primärtumorstadium.

Konsens besteht darin, dass ein Bronchialkarzinom im Stadium I-II (und IIIA) primär reseziert wird, sofern klinisch und funktionell Operabilität besteht. Bei inkompletter Resektion ist eine konventionelle perkutane Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von mindestens 60 Gy in sechs Wochen indiziert. Besteht trotz eines frühen Stadiums der Tumorerkrankung eine funktionelle Inoperabilität des Patienten, ist eine hochkonformale, hypofraktionierte Strahlentherapie indiziert [29].

Die Behandlung von Patienten mit einem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom im Stadium IIIA wird kontrovers diskutiert. Die Entscheidung zu einem operativen, chemotherapeutischen bzw. strahlentherapeutischen Vorgehen wird anhand der klinischen Situation des Patienten getroffen. Bei einem Tumorstadium T3 mit einem begrenzten mediastinalen Lymphknotenbefall mit nur einer Lymphknotenstation wird die Resektion empfohlen (Stadium IIIA_{1/2}). In einem fortgeschrittenen Stadium IIIA (IIIA₃ und IIIA₄), also N2-Status im präoperativen Staging und Multi-Level N2-Befall, oder im Stadium IIIB ist eine definitive kombinierte Radiochemotherapie Therapie der Wahl [29].

Bei Patienten mit einer großen Ausdehnung des Primärtumors (T4) in Kombination mit einem niedrigen Lymphknotenstatus sollte eine chirurgische Therapie angestrebt werden, die von einer adjuvanten Chemotherapie gefolgt wird [29].

Die Behandlungsstrategie im Stadium IV (ca. 40 - 50%) des Bronchialkarzinoms ist das Erreichen einer bestmöglichen palliativen Behandlung [29]. Bei bronchialokkludierendem Tumorwachstum haben sowohl die kleinvolumige, palliativ intendierte externe Strahlentherapie, die intraluminale Brachytherapie, wie auch Laser- und Stentbehandlung eine Bedeutung.

Tabelle 1: Stadieneinteilung des NSCLC (modifiziert nach [19])

Stadium	T	N	M	Medianes 5-Jahresüberleben [%]	Therapie
Ia	1a/b	0	0	50-73	Primäre Operation oder Strahlentherapie bei Kontraindikation
Ib	2a	0	0	43-58	
IIa	1a/b	1	0	36-46	Operation (+Chemotherapie) oder kombinierte Radiochemotherapie
	2a	1	0		
	2b	0	0		
IIb	2b	1	0	25-36	
	3	0	0		
IIIa	1-3	3	0	19-24	
	3	1	0		
	4	0/1	0		
IIIb	4	2	0	7-9	Radiochemotherapie oder primäre Strahlentherapie
	1-4	3	0		
IV	jedes	jedes	1a/b	2-13	Palliatives Therapievorgehen

Insgesamt sind nichtkleinzellige Bronchialkarzinome eine Tumorentität mit schlechter Prognose (Tabelle 1). Etwa zwei Drittel der Patienten sind aufgrund schwerwiegender Begleiterkrankungen sowie aufgrund der primären Tumorausbreitung primär inoperabel [29]. Daher spielt die Strahlentherapie in der Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms eine wichtige Rolle.

1.2. Einfluss von Hypoxie auf die Wirkung von Strahlung und Induktion von Veränderungen im Zellverhalten

Strahlung kann auf biologisch wichtige Zielmoleküle entweder direkte oder indirekte Effekte erzeugen:

Eine direkte Strahlenwirkung ist dadurch gekennzeichnet, dass eine Ionisation des biologisch kritischen Zielmoleküls (z. B. DNA) erfolgt und dadurch ein direkter Schaden hervorgerufen wird [36]. Bei der indirekten Strahlenwirkung erfolgt die Energieabsorption in einem Molekül, das nicht das biologisch kritische Zielmolekül ist. Die dadurch entstehenden Radikale schädigen erst sekundär über Radikalkettenreaktionen das Zielmolekül. Ein wichtiger Faktor für die indirekte Strahlenwirkung ist die Sauerstoffkonzentration im Gewebe. Sauerstoffreiche Tumorzellen sind um etwa den Faktor 3 strahlenempfindlicher [36]. Der Sauerstoffverstärkungsfaktor (oxygen enhancement factor) ist dabei definiert als das Verhältnis der Bestrahlungsdosen unter anoxischen bzw. unter oxischen Bedingungen, die zu der gleichen Überlebenswahrscheinlichkeit der bestrahlten Zellen führen.

Gewebe, die längere Zeit hypoxisch sind, passen sich dem Sauerstoff- und Nährstoffangebot insofern an, dass sie mit dem Angebot auskommen bzw. die Versorgungsverhältnisse zu steigern versuchen.

Dadurch stimuliert Hypoxie die Angiogenese und Glykolyse, reguliert die Apoptose und die Aktivität von Wachstumsfaktoren und anderer Proteine [14] [78] [77] [38]. Ein Beispiel hierfür ist die durch Tumorphypoxie induzierte Erhöhung des Hämoglobingehalts des Blutes durch Aktivierung von Erythropoetin, Transferrin und Transferrinrezeptoren, die zu einer Erhöhung der Sauerstoffbindungskapazität des Blutes führt [69] [48]. Ein weiterer wichtiger Effekt der Hypoxie ist die Regulation der Adhäsionsmoleküle. Sauerstoffminderversorgung führt dazu, dass Tumorzellen dazu neigen, sich aus dem Zellverband zu lösen. Damit steigt die Neigung eines Primärtumors zur Metastasierung [10]. Viele dieser Effekte, die durch Hypoxie ausgelöst werden, werden durch die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1 und HIF-2) reguliert.

1.3. Hypoxie-induzierbare Faktoren HIF-1alpha und HIF-2alpha: Bestrahlungseffekte und die Möglichkeit der Inhibition

Unter Hypoxie laufen in Tumorzellen die o.g. Anpassungsreaktionen auf die Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ab, die durch Transkriptionsfaktoren gesteuert werden.

Fällt der Sauerstoffpartialdruck in einem Tumor unter 10 mmHg, wird die Expression von sogenannten Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) im Tumor verstärkt und die Produktion der nachfolgenden Genprodukte erhöht [61].

Ein Beispiel für ein Gen, das der hypoxie-induzierten Transkription unterliegt, ist das Gen, das Erythropoetin kodiert. Die Untersuchung des „hypoxia-inducible enhancer 3“ führte zu der Entdeckung des „hypoxia response element“ (HRE), welches für die Hypoxie-getriggerte Transkription benötigt wird [41] [76]. Diese Erkenntnis erlaubte die Isolierung und Vervielfältigung eines Hypoxie-induzierbaren Dimers mit einer Untereinheit, die HIF-1alpha genannt wurde.

Im Weiteren wurde HIF-2alpha erforscht [23]. Beides sind „basic-Helix-Loop-Helix(bHLH)-Per-ARNT-Sim(bHLH-PAS)“ Proteine, deren DNA-Bindungsprotein „aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ (ARNT oder HIF-beta) genannt wird (Abbildung 1) [23].

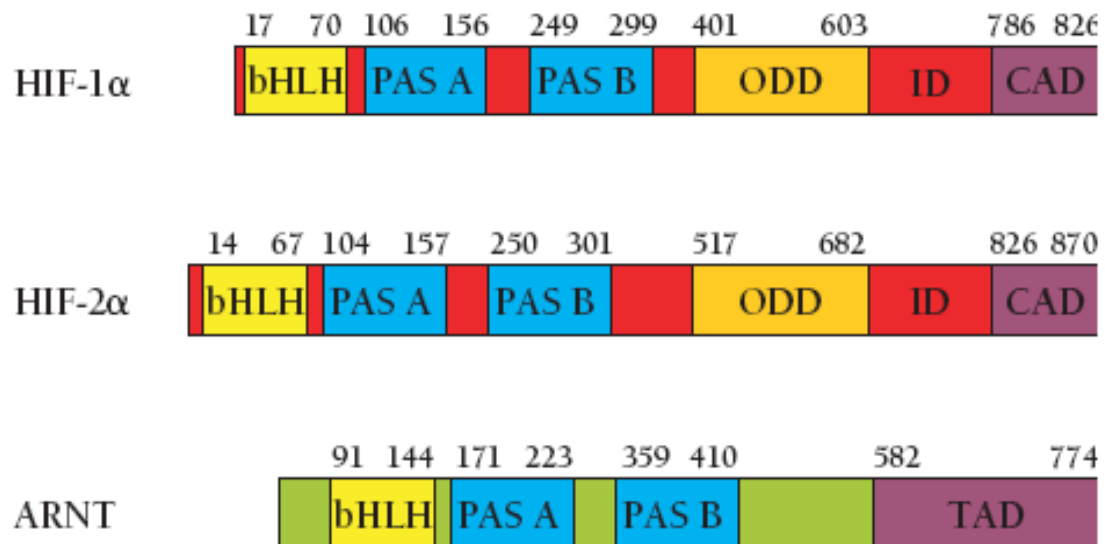


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von HIF-1alpha, HIF-2alpha und ARNT [23]

HIF-1alpha, HIF-2alpha und ARNT sind „basic-Helix-Loop-Helix(bHLH)-Per-ARNT-Sim(bHLH-PAS)“ Proteine, die eine N-terminale bHLH Domäne tragen. HIF1-alpha und HIF2-alpha enthalten zusätzlich eine sauerstoffabhängige Abbau-Domäne, die eine sauerstoffabhängige Stabilisierung vermittelt. Die C-terminale Transaktivations-Domäne (CAD) wird durch die inhibitorische Domäne (ID) in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration im Gewebe kontrolliert.

Die Regulation von HIF-2alpha entspricht weitgehend der von HIF-1alpha [74]. In Normoxie wird HIF-1alpha über enzymatische Hydroxylierung zweier Prolinreste innerhalb einer wichtigen funktionellen Domäne von HIF-1alpha degradiert. Diese führt zur Bindung an das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) und damit zum proteosomalen Abbau von HIF1-alpha (Abbildung 2) [74] [37]. Dieser Reaktionsweg ist in Hypoxie gehemmt, wodurch vermehrt HIF-alpha gebildet wird. Nachfolgend translozieren die Faktoren in den Zellkern und binden an den „aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ ARNT. Nach der Bindung an ARNT assoziieren beide an das „hypoxia response element“ (HRE) und induzieren damit die Transkription von Zielgenen. Mehr als 100 Zielgene, die über diesen Weg aktiviert werden, sind bis jetzt identifiziert. Darunter sind Proteine, die für Energiestoffwechsel, Zellproliferation, Apoptose, Hämatopoese und Angiogenese relevant sind [74].

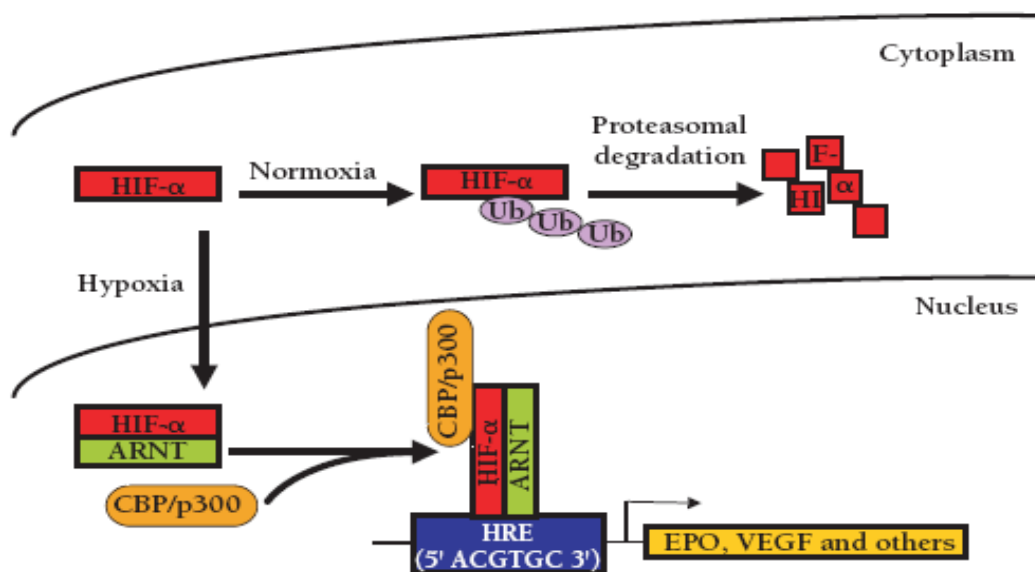


Abbildung 2: Regulation Hypoxie-induzierbarer Faktoren [23]

In Normoxie werden die Hypoxie-induzierbaren Faktoren sofort degradiert und über den Ubiquitin-Abbauweg eliminiert. In Hypoxie werden die Faktoren stabilisiert und nach Bindung an ARNT assoziieren diese an HRE. Nachfolgend kann die Translation von HIF-abhängigen Zielgenen induziert werden.

HIF-1alpha und HIF-2alpha haben einen hohen Anteil an gleichen Aminosäuresequenzen [23]. Für HIF-1alpha konnten viele Zielgene identifiziert werden [74]. In Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass HIF-2alpha nicht die gleiche Wirkung auf diese Gene hat, sondern einen größeren Einfluss auf die Vaskularisierung nimmt, als HIF-1alpha [45]. So kommt es im Mausmodell bei einem Ausfall des Tumorsuppressors pVHL zu einer vermehrten Bildung von Leberhämangiomen. Die angiogenetische Genexpression in Hepatozyten ist mit HIF-2alpha assoziiert. Für HIF-1alpha gilt dies jedoch nicht [69]. Neben gemeinsamen existieren auch spezifische Zielgene für HIF-1alpha und HIF-2alpha [18] [22]. Dieses lässt vermuten, dass HIF-1alpha und HIF-2alpha eine unterschiedliche Rolle bei der Tumorprogression spielen [70]. HIF-1alpha und HIF-2alpha beeinflussen sich gegenseitig negativ regulatorisch [71]. Weiterhin fördert HIF-2alpha prokanzerogene Gene wie Cyclin D1 oder TGF-alpha induzierte EGF- und VEGF-Expression [18] [22]. HIF-1alpha wirkt positiv auf das proapoptotische Gen BNip3 [92]. HIF-2alpha dagegen reguliert dieses nur eingeschränkt bzw. negativ [70].

Abgesehen von Hypoxie wird HIF-2alpha auch durch die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion des Wachstumsfaktors EGF aktiviert, dessen Inhibition zur Suppression von HIF-2alpha führen kann [79]. Das Gen des VEGF-Rezeptor-2 ist ein spezifisches Zielgen von HIF-2alpha, jedoch nicht für HIF-1alpha [79].

1.3.1. Bestrahlungseffekte auf die HIF-1alpha-Aktivität

Eine Bestrahlung kann zu einer Reoxygenierung hypoxischer Tumoranteile führen [36]. Ein wahrscheinlicher Grund hierfür ist der strahleninduzierte Zelltod vieler Tumorzellen und der dadurch resultierende verminderte Sauerstoffbedarf des Resttumors. Es wurde vermutet, dass die Aktivität von HIF-1alpha im Tumor mit einem steigenden Sauerstoffpartialdruck im Tumor stagniert. Tatsächlich wird die Expression von HIF-1alpha nach einer Bestrahlung jedoch deutlich verstärkt. Diese Verstärkung ist bis zu 72 Stunden nach der Bestrahlung nachzuweisen [59]. In NSCLC kommt eine Überexpression sowohl von HIF-1alpha als auch HIF-2alpha vor, wobei die HIF-2alpha-Expression zu einer verhältnismäßig schlechten Prognose führt.

Verschiedene Mechanismen werden für den Anstieg der Expression von HIF-1alpha verantwortlich gemacht:

Zum einen werden durch die Bestrahlung freie Radikale erzeugt, die zu einer Stabilisierung von HIF-1alpha führen und damit eine verstärkte Proliferation von Mikroblutgefäßen bewirken [20]. Zum anderen werden in Hypoxie „Stressgranula“ induziert. Diese sind Protein-mRNA-Komplexe, die eine Zelle unter Stress bildet und sie vor einem Energieverlust durch Translationsaktivität schützen. Stressgranula bilden sich in Hypoxie und werden bei einer Reoxygenierung wieder freigesetzt. Nach der Freisetzung laufen Transkriptionsprozesse verstärkt ab, somit auch die Transkription und Freisetzung von HIF-1alpha [59] [62]. Als weiterer Grund für die vermehrte HIF-1alpha-Expression ist eine Infiltration von Makrophagen in bestrahlte Tumoren zu nennen. Makrophagen reagieren auf die durch Bestrahlung induzierte Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Konzentration im Gewebe [20]. In Versuchsreihen wurde durch Stickstoffmonoxid-Blockade oder Inhibition von Makrophagen die vermehrte Transkription von HIF-1alpha verhindert [67]. Ein Grund dafür ist, dass Stickstoffmonoxid für die Stabilisierung von HIF-1alpha

essentiell ist und eine Erkennung des HIF-alpha durch den VHL-Komplex verhindert (Abbildung 3) [20] [67].

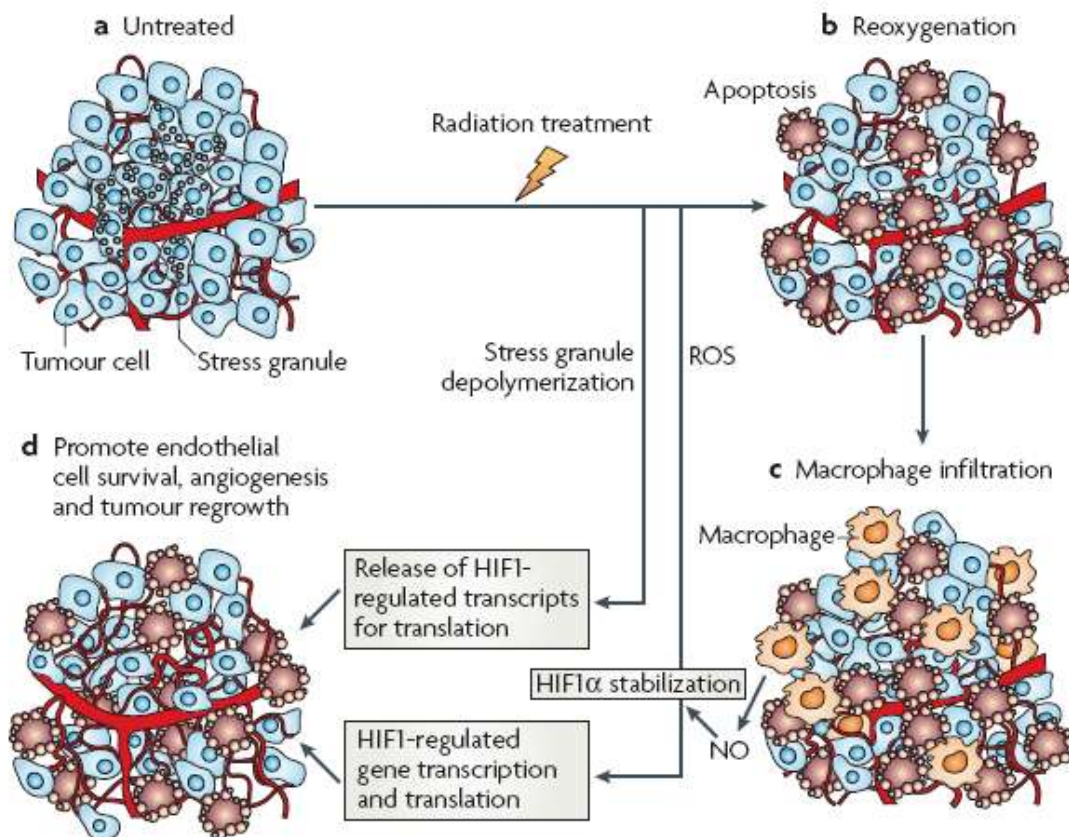


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mechanismus der strahleninduzierten Regulation von HIF-1alpha [20]

Unbehandelte Tumoren haben zum Teil große hypoxische Bereiche. Eine Photonenbestrahlung induziert über indirekte Strahleneffekte Sauerstoffradikale (ROS). Darüber hinaus induziert Strahlung in Tumoren Apoptose und über diesen programmierten Zelluntergang die vermehrte Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO). Sowohl ROS als auch NO führen zu einer Stabilisierung von HIF-1alpha und darüber zur Anpassung der Genexpression in malignen Tumoren.

1.3.2. Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) über small interfering RNA (siRNA)

Die RNA-Interferenz (RNAi) wird über die small interfering RNA (siRNA) vermittelt. Längere dsRNA wird durch das Protein Dicer, eine Endonuklease des RNase III-Typs, in 19-mere RNA Duplexe zerschnitten, die an den 3'-Enden symmetrische Überhänge von zwei Nukleotiden enthalten. Diese kurzen

dsRNAs werden als siRNAs bezeichnet. Eine anschließende Phosphorylierung der 5'-Enden der siRNA-Duplex führt zu deren Aufnahme in den proteinhaltigen RNA-induced silencing complex (RISC) [33]. Die Bindung der siRNA an die Ziel-mRNA wird über RISC vermittelt [50]. Dabei bestimmt die relative Stabilität der Enden des siRNA-Duplexes, welcher Strang („guide“-Strang) sich an die mRNA bindet [50] [57] [68]. Die genaue Zusammensetzung des RISC ist noch nicht abschließend geklärt. In jedem Falle sind aber Proteine der Argonaut-Familie oder ihre Homologe Bestandteile des Komplexes. Der gebundene „guide“-Strang programmiert RISC, spezifisch mit einer RNA zu interagieren, die eine komplementäre Sequenz aufweist. Das entsprechende Molekül wird gebunden und die mRNA wird nach dem 10. gebundenen Nukleotid des 5'-Endes des Leitstranges der siRNA gespalten [95]. Die beschädigte Ziel-mRNA wird anschließend durch zelluläre Nukleasen abgebaut, während der beladene RISC weitere Spaltungsreaktionen durchführen kann [82].

1.4. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Hypoxie hat einen wichtigen Einfluss auf die Strahlen- und Chemotherapiesensibilität solider Tumoren. Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF-1alpha und HIF-2alpha) werden in Hypoxie vermehrt exprimiert. Sie steuern durch spezifische Zielgenaktivierung die Anpassung des Tumors an das hypoxische Mikromilieu.

Es sind über 100 Zielgene von HIF-1 und HIF-2 bekannt, die in Angiogenese, Apoptose und Metabolismus eines Tumors eingreifen [75] [78]. Die Aktivierung dieser Zielgene wirkt sich nachteilig auf das Gesamtüberleben des Patienten aus, da diese eine Resistenz der Tumoren gegenüber Strahlen- bzw. Chemotherapie vermitteln [91] [87] [88] [1] [45] [89] [4]. Eine Ausschaltung der Genaktivität über Inhibition von HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha stellt daher einen möglichen Angriffspunkt für die Vermeidung der Strahlenresistenz maligner Tumoren dar [78].

Das Bronchialkarzinom gehört zu den häufigsten Karzinomen des Menschen [6]. Die Strahlentherapie ist - oft im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte - eine Standardtherapie vor allem des fortgeschrittenen Bronchialkarzinoms [55]. Trotz deutlicher Fortschritte in den letzten Jahrzehnten stellt insbesondere die Behandlung solch fortgeschrittener Tumore weiterhin eine therapeutische Herausforderung dar, da die Lebenserwartung von Patienten in diesen Tumorstadien nur unwesentlich verbessert werden konnte [8].

In fortgeschrittenen Tumoren kommen vermehrt hypoxische Areale vor [63]. Diese Areale sind strahlenresistent und bewirken die Aktivierung von HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha [70] [96].

Ziel dieser Arbeit war daher die Überprüfung der Strahlensensibilität von humanen alveolarepithelialen Adenokarzinomzellen (A549) nach spezifischer Inhibition der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1alpha und HIF-2alpha.

Hierzu wurde zunächst im Tiermodell der Einfluss einer Photonenbestrahlung auf subkutan implantierte A549-Zellen getestet. In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1alpha und HIF-2alpha auf die A549-Tumoren getestet.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

A: Untersuchung des Effektes einer perkutanen Photonenbestrahlung auf humane Adenokarzinomzellen (A549) im murinen Xenograftmodell

- Können in dem gewählten Xenograftmodell mit perkutaner Bestrahlung und den gewählten Bestrahlungsparametern Effekte auf das Tumolvolumen gemessen werden?
- Können Effekte der perkutanen Bestrahlung immunhistochemisch dargestellt werden?

B: Untersuchung der Effekte einer spezifischen Inhibition der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha auf subkutan implantierte A549-Tumoren unter besonderer Berücksichtigung der Radiosensitivität der Tumoren

- Wie verändert eine spezifische Inhibition der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1alpha und HIF-2alpha in Kombination mit einer perkutanen Bestrahlung das Wachstumsverhalten der subkutanen A549-Tumoren?

2. Materialien und Methodik

2.1. Zellkultur

2.1.1. Humane Adenokarzinomzellen A549

In den Versuchen wurde die Tumorzelllinie A549 des humanen alveolarepithelialen Adenokarzinoms verwendet (A549, „non-small cell lung cancer“ NSCLC, ATCC-Nr.: CCL-185), die über die Firma ATCC bezogen wurde. Die Zelllinie wurde 1972 im Rahmen einer Lobektomie bei einem 58-jährigen männlichen Patienten isoliert und 1973 erstmals beschrieben [27] [52].

2.1.2. Zellkulturmedium

Die Kultivierung der A549 Zellen erfolgte als Monolayer in Kulturmedium, das unter sterilen Bedingungen hergestellt wurde und sich wie folgt zusammensetzte:

- 86% DMEM-F12 (DMEM : F-12 (1:1) 500 ml, -L-Glutamin, Gibco, Karlsruhe)
- 10% FCS (fötales Kälberserum, steril filtriert, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich),
- 1% nicht essentielle Aminosäuren (MEM NON-essential Amino Acids, Gibco, Karlsruhe)
- 1% L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe)
- 1% Gentamycin/Penicillin G (lyophilisiert, steril, Gibco, Karlsruhe)
- 1% Vitamin (MEM Vitamin solution, Gibco, Karlsruhe)

Die ausführliche Auflistung und Beschreibung der verwendeten Materialien und Geräte findet sich im Anhang (siehe 7.5).

2.1.3. Auftauen und Kultivierung der Zellen

Da die Zellen nicht stetig für Versuche gebraucht wurden, wurden sie zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert und für die Versuche aufgetaut. Hierfür wurden die Zellen, die in Kryoröhrchen gelagert waren, in ein 37 °C warmes Wasserbad verbracht. Nach dem vollkommenen Auftauen wurden die Zellen unter der Sterilbank in eine mit vorgewärmtem Kulturmedium gefüllte Kulturschale überführt und anschließend in einem Brutschrank bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95% für 24 h kultiviert.

Nach 24 h wurde das Kulturmedium gewechselt. Stammkulturen wurden in Gewebekulturflaschen gezüchtet und 2-3 mal wöchentlich passagiert. Hierzu wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und die adhärenen Zellen mit PBS-Lösung gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin vom Schalenboden abgelöst. Dieser Vorgang wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei vollständiger Ablösung wurden die Zellen in ein mit 1 ml fötalem Kälberserum (FCS) gefülltes 50 ml Röhrchen überführt. Verbleibende Zellen wurden mittels Spülen mit dem Kulturmedium von der Platte abgelöst und in das gleiche Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde 5 min mit 248 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der Bodensatz mit 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden jeweils 1 Millionen Zellen in entsprechenden Volumina der Lösung in eine neue Kulturschale ausgesät. Der Zellgehalt pro Volumen wurde mittels Neubauerzählkammer ermittelt.

2.1.4. Zellvorbereitung für *in vivo* Experimente

Zur Implantation der A549-Zellen in Versuchstiere wurden die Zellen aus der Kulturschale abgelöst, zentrifugiert und in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach Ermittlung der Gesamtzellzahl mittels einer Neubauerzählkammer wurde eine Zellsuspension aus 5 Millionen Zellen in 200 µl steriler Kochsalzlösung hergestellt. Hierzu wurde die Zellsuspension nach dem Zählen in ein neues Röhrchen überführt, erneut zentrifugiert und das Zellpellet mit der zu applizierenden Menge physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Diese Suspension wurde steril in eine 1 ml Spritze mit einer Feinnadel aufgezogen.

Die restlichen Zellen aus dem Kulturmedium wurden erneut zur Kultivierung ausgesät.

2.1.5. Einfrieren und Langzeitlagerung der Zellen

Nicht benötigte Zellen wurden zur Langzeitlagerung eingefroren. Hierfür wurden zwei Einfriermedien verwendet:

Zur Herstellung eines **ersten Mediums** wurden 9 ml Kulturmedium und 1 ml 0,2 M Hepes benutzt. Das **zweite Medium** bestand aus 5 ml des ersten Mediums und 0,5 ml DMSO. Beide Medien wurden steril hergestellt und vor der Verwendung mit Eis gekühlt. Die nicht benötigten Zellen wurden von ihrer Schale gelöst, suspendiert und das Medium abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Danach wurden auf das Zellpellet 500 µl des ersten Mediums gegeben und für ca. eine Minute auf Eis gestellt. Danach wurde resuspendiert und die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde weitere 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 500 µl des zweiten Mediums dazugegeben, die Suspension für weitere 2 - 3 h bei – 20 °C und danach über einen Tag bei – 80 °C gelagert. Daraufhin wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung eingelagert.

2.2. siRNA

2.2.1. Auswahl und Aufbereitung der siRNAs

Die siRNA mit der in Tabelle 2 beschriebenen Sequenz diente zur spezifischen Inhibition der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1alpha (GenBank Accession No. NM001530) und HIF-2alpha (GenBank Accession No. NM001430) [80] [44] [43]. Als Kontrolle wurde eine zufällige siRNA-Sequenz (siRNA-Random) gewählt, die nach Überprüfung gegen die Human- und Maus-Datenbank keine Sequenzübereinstimmung gegen bekannte Sequenzen zeigt.

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten siRNAs (Biomers, Ulm)

Bezeichnung der verwendeten siRNA	Sequenz der siRNA
HIF-2 α -siRNA-forward	CAGCAUCUUUGAUAGCAGU (dtdt)
HIF-2 α -siRNA-reverse	ACUGCUAUCAAAGAUGCUG (dtdt)
HIF-1 α -siRNA-forward	CUGAUGACCAGCAACUUGA (dtdt)
HIF-1 α -siRNA-reverse	UCAAGUUGCUGGUCAUCAG (dtdt)
siRNA-ran-forward	UACACCGUUAGCAGACACC (dtdt)
siRNA-ran-reverse	GGUGUCUGCUAACGGUGUA (dtdt)

2.2.2. Herstellung der Transfektionsmischung

Zur Herstellung der Transfektionsmischung wurde die siRNA mit 10%iger Glukoselösung versetzt, sodass eine 5%ige siRNA-Glukoselösung in einem Cup vorlag. In einem zweiten Cup wurde *in vivo* jetPEITM mit Aqua injectabile auf die gewünschte Konzentration verdünnt und mit dem gleichen Volumen 10%iger Glukoselösung gemischt, sodass eine 5%ige Glukoselösung vorlag. Beide Cups wurden kurz gevortext und anschließend die PEI-Lösung in das Cup mit der siRNA überführt und nachfolgend 15 min zur Inkubation auf den Rüttler gestellt. Danach wurde diese Mischung in eine 1 ml Spritze mit einer Feinnadel zur Injektion vorbereitet.

2.2.3. Injektion der siRNAs

Die Injektion der siRNA gegen HIF-1 α bzw. HIF-2 α erfolgte bei den Versuchstieren intraperitoneal. Als Transfektionsmedium wurde jetPEITM benutzt und in Kombination mit der jeweiligen siRNA appliziert. Der Zeitpunkt der Injektion war je nach Versuchsdesign unterschiedlich (siehe 2.4.).

2.3. In vivo Versuche

2.3.1. Versuchstiere

Für die *in vivo* Versuche wurden männliche Nacktmäuse des Stamms CD nu/nu in einem Alter von 5 - 6 Wochen verwendet. Tiere dieses Stamms zeichnen sich dadurch aus, dass sie Träger einer Mutation im nude-Gen sind. Diese Mutation hat eine Thymusaplasie zur Folge, die eine fehlende T-Zell-Population und dadurch eine Immuninkompetenz bewirkt. Hierdurch tolerieren die Tiere Allo- und Xenotransplantate.

Das Gewicht der Mäuse betrug zu Beginn der Versuche 23 - 33 g. Nach Lieferung der Tiere (Charles River, Deutschland GmbH, Sulzfeld) wurde vor Versuchsbeginn ein behandlungsfreies Zeitintervall von 24 - 48 h eingehalten, in dem die Gruppeneinteilung und Aufteilung der Tiere in die einzelnen Tierkäfige vorgenommen wurde. Dieses Zeitintervall diente dazu, dass sich die Tiere von Stressfaktoren durch den Transport erholen und sich an die Unterbringung in den Versuchsgruppen gewöhnen konnten. Die Unterbringung der Tiere erfolgte im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Betreuung (Fütterung, Reinigung und Käfigstreu) der Tiere durch fachkundiges Pflegepersonal war somit gewährleistet. Die Tierversuche waren durch den Tierversuchsantrag Az.: V54-19c 20-15 (1) GI 20/10 Nr. 27/2006 und dessen Nachfolgeanträge genehmigt.

2.3.2. Narkose der Versuchstiere

Die Tiere wurden zur Implantation der Tumorzellen, zur Bestrahlung, zur Aufnahme der MRT-Perfusionsbilder und zur finalen Präparation narkotisiert. Hierzu wurde eine Lösung aus 20 µl Ketavet, 20 µl Rompun und 50 µl NaCl hergestellt. Diese Lösung wurde in einer Dosierung von 40 - 60 µl pro Tier intraperitoneal injiziert.

Nach einer Einwirkzeit von 5 - 10 min waren die Tiere vollständig betäubt. Die Zunge der Tiere wurde mit einer geraden glatten Pinzette vorgezogen, um das Zurückfallen der Zunge und damit eine Verlegung der Atemwege zu verhindern.

Zudem wurde Bepanthen Augen- und Nasensalbe auf die Kornea gegeben, um deren Austrocknen unter Narkose zu verhindern. Da die Tiere dazu neigen, in Narkose Körperwärme zu verlieren, wurden sie zur Implantation der Tumorzellen, zur Lagerung während der Bestrahlung und der MRT auf einer Wärmeunterlage gelagert.

2.3.3. Subkutane Injektion der Tumorzellen

Dem narkotisierten Tier wurden 5 Millionen Zellen der Linie A549 (siehe 2.1.1) in 200 µl physiologischer Kochsalzlösung subkutan in die rechte oder linke Flanke injiziert.

2.3.4. Messung des Tumorummens

10 - 14 Tage nach Injektion der Tumorzellen wurde an der Flanke der Tiere makroskopisch ein Tumor sichtbar. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Tumorummwachstum mittels Messschieber in Intervallen von 3 - 4 Tagen bestimmt. Hierzu wurden die maximale Länge und die kleinste Breite des Tumors gemessen.

Aus diesen Messwerten wurde mit der Formel:

$$V[\text{mm}^3] = \sqrt{\frac{\text{Länge}[\text{mm}] \cdot \text{Breite}[\text{mm}]^2}{2}} \quad [17] \quad [62]$$

das Volumen des Tumors in mm³ berechnet. Zur Bestimmung des Messfehlers wurden bei 5 Tieren Testmessungen vorgenommen, bei denen die Tumoren mehrfach gemessen wurden. Hierbei ergaben sich Messfehler von 10 - 15%.

2.3.5. Experimenteller Aufbau der Bestrahlungsversuche

Die Bestrahlung der Tiere wurde in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Die Tiere wurden auf der tumorabgewandten Flanke liegend in einem Plexiglaszylinder in die Lagerungsvorrichtung eingebracht und fixiert (Abbildung 4). Die

Lagerungsvorrichtung bestand ebenfalls aus Plexiglas (Dicke 20 mm) und diente neben der Fixierung der Tiere der Optimierung der Tiefendosiskurve.

Die Bestrahlung erfolgte mit Photonen der Energie 6 MeV am Linearbeschleuniger (Linear Accelerator; Elekta Precise; Elekta MLCi 80 Leaf; dMLC & AFS; 6&10 MV; 6,9,12,15,18 MeV, Elekta, Stockholm) über ein tangenciales Stehfeld der Feldgröße 3 x 3 cm bei einem Fokus-Hautabstand von 1 m und einem Gantrywinkel von 90°. Das Dosismaximum lag in 18 mm Gewebstiefe. Abhängig vom Versuch wurde eine Einzeldosis von 1,5 - 2,0 Gy appliziert.

Versuchslagerung zur perkutanen Bestrahlung



Abbildung 4: Darstellung der Lagerung eines Versuchstiers zur perkutanen Bestrahlung

Links: Das betäubte Versuchstier wird in einen Plexiglaszylinder verbracht

Mitte: Lagerungsvorrichtung aus Plexiglas vor der Gantry (90°-Stellung)

Rechts: Das betäubte Versuchstier liegt in dem Plexiglaszylinder in der Lagerungsvorrichtung

2.3.6. MRT-Perfusionsmessung der subkutan gelegenen A549-Tumoren bei CD1 nu/nu Mäusen

Zur Darstellung der Perfusionsverhältnisse im Tumor wurden MRT-Perfusionsmessungen durchgeführt. Diese Messungen erfolgten in der Klinik für Strahlendiagnostik der Philipps-Universität Marburg.

Die Tiere wurden narkotisiert und für die Untersuchung entsprechend im Gerät gelagert. Hiernach wurde eine Schwanzvene mittels einer 1 ml Einmal-Feindosierungsspritze mit einer Feinnadel punktiert und 1,0 ml gadoliniumhaltiges Kontrastmittel appliziert. Nach Injektion des Kontrastmittels wurde direkt eine MRT-Sequenz gestartet, mit der über einen Zeitraum von 72 Sekunden Aufnahmen des Anreicherungsverhaltens des Kontrastmittels im Tumor dokumentiert wurden. Die dynamische Anflutung des Kontrastmittels wurde in drei verschiedenen Schnitten, die in Höhe des Tumorbettes, aus der Mitte des Tumors und am Tumordach gelegen waren, gemessen. Zur Differenzierung der Anflutungsgeschwindigkeit wurden in den drei beobachteten Schnitten Messungen in der Peripherie bzw. im Tumorzentrum vorgenommen und diese graphisch ausgewertet.

2.3.7. Präparation der Tumoren nach Versuchsabschluss

Nach Abschluss eines Versuchs wurden die Tumoren aus den Versuchstieren präpariert. Hierzu wurden die Tiere mit einer Überdosis mit Pentobarbital getötet. Nach Eintritt des Todes wurden die Tiere auf einer Präparationsunterlage mittels Nadeln auf dem Bauch liegend an den Extremitäten fixiert. Mittels einer scharfen spitzen Präparationsschere wurde ein Hautlappen über dem Tumor nach lateral weggeklappt und mittels Nadeln auf der Präparationsunterlage fixiert. Der freiliegende Tumor wurde mit feiner Präparationsspinzette und Schere präpariert. Der Tumor wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und zur weiteren Aufbewahrung in Kryoröhrchen bei - 80 °C gelagert.

2.4. Allgemeiner Versuchsaufbau

In der Arbeit wurden zwei Fragestellungen bearbeitet, die jeweils unterschiedliche Versuchsaufbauten erforderten:

2.4.1. Bestrahlungseffekte auf das Tumolvolumen von subkutan implantierten A549-Tumoren im Xenograftmodell

Für den **ersten Teil der Arbeit** wurde ein Versuchsaufbau gewählt, mit dem ermittelt wurde, ob mit den gewählten Bestrahlungsparametern ein Effekt auf das Tumolvolumen erzielt werden kann. Hierzu wurden jeweils zwei Versuchsgruppen mit fünf Tieren gebildet. Nach erfolgreicher Tumorerzeugung wurden die Tiere einer der Behandlungsgruppe bestrahlt, Tiere in der Kontrollgruppe wurden nicht bestrahlt. In beiden Gruppen wurden in einem Abstand von 3 - 4 Tagen die Volumina der Tumoren bestimmt und **Tumolvolumenkurven** erstellt.

Im Anschluss wurden die Tiere getötet und die Tumoren für weitere Analysen präpariert. Diese beinhalteten eine immunhistologische Auswertung des Angiogenese-, Proliferations- und Apoptoseverhaltens der bestrahlten Tumoren im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

2.4.2. Effekt einer alleinigen Bestrahlung oder einer spezifischen Inhibition der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1alpha und HIF-2alpha mit siRNA oder der Kombination beider Verfahren

Für den **zweiten Teil der Arbeit** wurde ein Versuchsaufbau gewählt, bei dem die Wirkung einer alleinigen perkutaner Bestrahlung bzw. einer alleinigen Injektion der spezifischen siRNA oder einer Kombination aus perkutaner Bestrahlung und spezifischer Inhibition von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha) mit siRNA gemessen werden konnte. Als Maß für den antitumorösen Effekt dieser Behandlungen diente die

Wachstumsverzögerung des Tumors durch die jeweilige Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Wachstumsverzögerung:

Verbleiben nach einer Behandlung vitale Tumorzellen in einem soliden Tumor, fängt dieser nach einer Phase von Schrumpfung oder Wachstumsstillstand wieder an zu wachsen. Die Phase der Schrumpfung bzw. des Wachstumsstillstands erzeugt eine Wachstumsverzögerung der Tumoren bei behandelten Tieren im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe (Abbildung 5). Zur Messung der Wachstumsverzögerung wurden spezifische Start- bzw. Endvolumina der Tumoren definiert. Nach Erreichen des definierten Tumorstartvolumens wurde die vorgegebene Einzel- oder Kombinationstherapie appliziert. Im Folgenden verblieben die Tumoren ohne weitere Behandlung und es wurde die Zeit ermittelt, bis ein vorgegebenes Tumorendvolumen erreicht wurde. Bei einer guten therapeutischen Wirkung der Einzel- bzw. Kombinationstherapie nimmt die Wachstumsverzögerung der therapierten Gruppe zu.

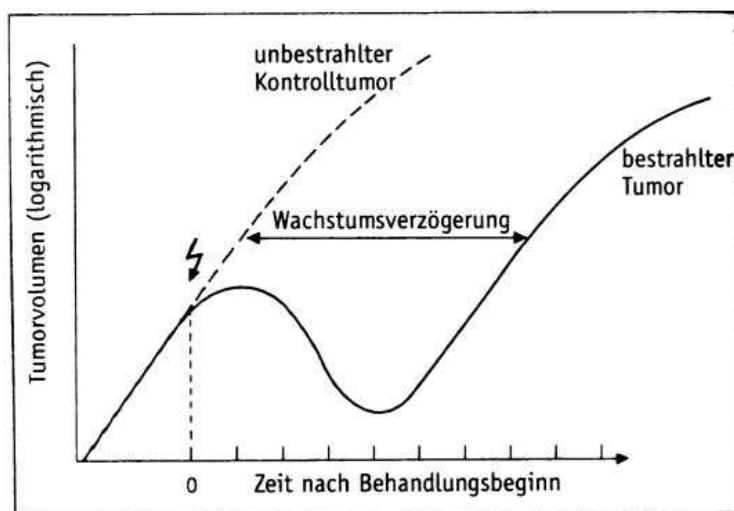


Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung einer Wachstumsverzögerung eines bestrahlten Tumors im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrolltumor [36]

Für die Versuche wurden Gruppen von Tieren gebildet, die entweder keiner weiteren Therapie unterzogen wurden (Kontrollgruppe) bzw. einer spezifischen Einzeltherapie (siRNA-Injektion (3.3.2) oder Bestrahlung (3.3.1)) oder einer Kombinationstherapie (Bestrahlung und siRNA-Injektion (3.3.3)) unterzogen

wurden. Die Anzahl der Versuchstiere betrug fünf (3.3.1/3.3.2) bzw. sechs (3.3.3) Tiere pro Gruppe.

Es wurden Wachstumskurven und Wachstumsverzögerungskurven erstellt. Zur Erstellung der Wachstumskurven wurden die Tumorumfänge in den Gruppen während der Versuche in einem 3-4 tägigen Intervall bestimmt. Nach erfolgreicher Tumorerzeugung und Erreichen des Startpunktes (erreichtes Tumorumfang von $200 \text{ mm}^3 \pm 10\%$) wurde mit der jeweiligen Behandlung der Tiere begonnen. Nach abgeschlossener Behandlung wurde die Zeit gemessen, die die Tumoren benötigten, um den Endpunkt (erreichtes Tumorumfang von 400 mm^3) zu erreichen. Da die Zeiten bis zum Erreichen des Tumorstartvolumens verschieden waren, war der Beginn der Versuche nicht synchron. Um bei einer 3-4 tägigen Tumorumfangmessung und unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren eine Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden bestimmte erreichte Tumorumfänge festgesetzt. Die Tage bis zum Erreichen wurden dabei ins Verhältnis gesetzt. In allen Gruppen wurde die Zahl der Versuchstage bis zum Erreichen der Tumorumfänge von 250 mm^3 , 300 mm^3 , 350 mm^3 und 400 mm^3 gemessen. Aus dem Wachstumsverlauf wurde die Wachstumsverzögerung vom Erreichen des Startpunktes bis zum Erreichen des Endpunktes des Versuchs rechnerisch ermittelt sowie graphisch und tabellarisch dargestellt. Im Anschluss wurden die Tiere getötet und die Tumoren für weitere Analysen präpariert.

2.4.3. Rechnerische Ermittlung der Wachstumsverzögerung

Neben der Bestimmung der Wachstumsverzögerung mittels graphischer Darstellung können rechnerisch Werte für den zeitlichen Umfang der Wachstumsverzögerung ermittelt werden [58]. Die absolute Wachstumsverzögerung (W_{absolut}) ist die Zeit, die ein unbehandelter Tumor benötigt, um vom Tumorstartvolumen ($200 \text{ mm}^3 (\pm 10\%)$) auf das Tumorendvolumen (400 mm^3) zu wachsen ($T_{\text{untreated}}$), subtrahiert von der Zeit, die ein behandelter Tumor für diese Volumenzunahme benötigt (T_{treated}).

$$W_{\text{absolut}} = T_{\text{treated}} - T_{\text{untreated}} \quad [58]$$

Zusätzlich wurde die normalisierte Wachstumsverzögerung ($W_{\text{normalized}}$) der Kombinationstherapien ermittelt. Diese errechnet sich durch Subtraktion der absoluten Wachstumsverzögerung einer Einzeltherapie (W_{single}) von der absoluten Wachstumsverzögerung durch eine Kombinationstherapie (W_{kombi}).

$$W_{\text{normalized}} = W_{\text{kombi}} - W_{\text{single}} \quad [58]$$

Der „Verstärkungsfaktor“ E gibt an, in wie weit eine Kombinationstherapie effektiver wirkt als eine Monotherapie. Der Verstärkungsfaktor E errechnet sich aus der normalisierten Wachstumsverzögerung einer Kombinationstherapie ($W_{\text{normalized}}$) dividiert durch die absolute Wachstumsverzögerung der alleinigen Bestrahlung (W_{absolut}).

$$E = \frac{W_{\text{normalized}}}{W_{\text{absolut}}} \quad [58]$$

2.5. Histologische Untersuchungen

Die histologische Auswertung der bestrahlten Tumoren diente zur Beurteilung und Charakterisierung des strahleninduzierten Effekts auf die subkutan liegenden Tumoren (2.4.1). Hierzu wurde anhand von Gefrierschnitten die Tumorgroße (in mm²) vermessen und das relative Verhältnis zwischen vitalem und nekrotischem Gewebe ermittelt. Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurden immunhistochemische Färbungen zur Prüfung der Angiogenese, Proliferation und Apoptose durchgeführt.

2.5.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Für die Anfertigung der Tumorschnitte wurden die Tumoren eine Stunde vor dem Schneiden in einem Einbettgefäß in einen – 20 °C kalten Kryostat gelegt. Die Tumoren wurden in dem Einbettgefäß mit einer Fixationssubstanz (Tissue Tek) fixiert. Weiterhin wurde ein neues Mikrotom-Messer in den Messerhalter eingesetzt. Nach Aushärten des Tissue Tek wurde der entstandene Block mit

dem Mikrotom in groben Schritten angeschnitten. Bei Erreichen des Tumors wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Es wurden jeweils 15 aufeinanderfolgende Schnitte aus dem Tumorzentrum angefertigt. Diese Schnitte wurden auf einen Objektträger verbracht und mit fortlaufenden Nummern gekennzeichnet. Nach dem Antrocknen der Schnitte wurden die Objektträger bis zur weiteren Verarbeitung in Präparatekästen sortiert und bei – 20 °C bis zum Färben gelagert.

2.5.2. Färbung

2.5.2.1. Nachweis von Angiogenese in A549-Tumoren nach einer Bestrahlung

Die zwischengelagerten Schnitte wurden für den Nachweis einer Angiogenese in eine Färbekammer, die bis zu einer Höhe von 1 cm mit destilliertem Wasser befüllt war, gelegt und mit einem Gemisch aus Methanol und Aceton (1:1) für 10 min fixiert.

Für die Färbung wird PBS-Lösung benötigt.

Herstellung 1 Liter 10-facher PBS-Lösung: 80 g NaCl (Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe) + 2 g KCl + 11,5 g Na₂HPO₄ x 2H₂O + 2 g KH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt) + 900 ml Aqua dest. wurden gemischt und mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt. Mit Hilfe des pH-Meters wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

Herstellung 500 ml 1-facher PBS-Lösung: 50 ml 10-facher PBS-Lösung + 450 ml Aqua tridestillata.

In der Folge wurden die Schnitte mit einer einfachen PBS-Lösung, die zusätzlich 0,1% Bovines Serum Albumin (BSA) und 0,2% Triton enthielt, mehrfach gewaschen. Nach diesem Waschvorgang wurden die unspezifischen Bindungen mit einfacher PBS-Lösung und 3% BSA für 60 min geblockt. Danach wurde die Lösung abgekippt und 1 ml des primären CD31-Antikörpers für 2 h bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mehrfach mit der PBS-Lösung gründlich gewaschen. Im darauf folgenden Schritt wurden 2 ml des sekundären Antikörpers (Alexa Fluor 488,

goat-anti-rat IgG (H+L), 2 mg/ml, 1:1000, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) für eine Stunde auf den Schnitten inkubiert. Danach wurden die Lösungen abgekippt und die Schnitte mit PBS-Lösung gewaschen, um danach mit 1 μ M DAPI-Lösung für 5 min gefärbt zu werden. Nach einem abschließenden Waschvorgang wurden die Gewebsschnitte mit drei Tropfen Fluoreszent-Mounting-Medium beschichtet und mit Deckgläschen eingedeckt. Die Schnitte wurden zum Trocknen lichtgeschützt bei Raumtemperatur in eine Präparatmappe gelegt und bei 4 °C gelagert. Nachfolgend wurde die Angiogenese mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt (siehe Kapitel 2.6).

2.5.2.2. Nachweis von Proliferation in A549-Tumoren nach einer Bestrahlung

Die Schnitte wurden für den Nachweis der Proliferation in eine Färbekammer, die bis zu einer Höhe von ca. 1 cm mit destilliertem Wasser befüllt war, gelegt und danach mit einem Gemisch aus Methanol und Aceton (1:1) für 10 min fixiert. In der Folge wurden die Schnitte mit einer einfachen PBS-Lösung, die zusätzlich 0,1% BSA und 0,2% Triton enthielt, mehrfach gewaschen. Nach diesem Waschvorgang wurden die unspezifischen Bindungen mit einfacher PBS-Lösung und 3% BSA für 60 min geblockt. Danach wurde die Lösung abgekippt und 1 ml des primären Ki67-Antikörpers für 2 h bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mehrfach mit der PBS-Lösung gewaschen und danach 2 ml des sekundären Antikörpers (Alexa Fluor 488, goat-anti-rabbit IgG (H+L), 2 mg/ml, 1:1000, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) für 1 h auf den Schnitten inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Schnitte mit PBS-Lösung gewaschen, um danach mit 1 μ M DAPI-Lösung für 5 min gefärbt zu werden. Nach einem abschließenden Waschvorgang wurden die Gewebsschnitte mit drei Tropfen Fluoreszent-Mounting-Medium beschichtet und mit Deckgläschen abgedeckt. Die Schnitte wurden zum Trocknen lichtgeschützt bei Raumtemperatur in eine Präparatmappe gelegt und bei 4 °C gelagert. Nachfolgend wurde die Proliferation mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt (siehe Kapitel 2.6).

2.5.2.3. Nachweis von Apoptose in A549-Tumoren nach einer Bestrahlung

Die zwischengelagerten Schnitte wurden für den Nachweis der Apoptose in eine Färbekammer, die bis zu einer Höhe von 1 cm mit destilliertem Wasser befüllt war, gelegt und mit einem Gemisch aus Methanol und Aceton (1:1) für 10 min fixiert. In der Folge wurden die Schnitte mit einer einfachen PBS-Lösung, die zusätzlich 0,1% BSA und 0,2% Triton enthielt, mehrfach gewaschen. Die unspezifischen Bindungen wurden mit einfacher PBS-Lösung und 3% BSA für 60 min geblockt. Danach wurde die Lösung entfernt und 1 ml des primären Caspase-3-Antikörpers für 2 h bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mehrfach mit PBS-Lösung gewaschen. Hiernach wurden 2 ml des sekundären Antikörpers (Alexa Fluor 488, goat-anti-rab IgG (H+L), 2 mg/ml, 1:1000, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) für 1h auf den Schnitten inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt und die Schnitte mit PBS-Lösung gewaschen, um danach mit 1 µM DAPI-Lösung für 5 min gefärbt zu werden. Nach einem abschließenden Waschvorgang wurden die Gewebsschnitte mit drei Tropfen Fluoreszent-Mounting-Medium beschichtet und mit Deckgläschen abgedeckt. Die Schnitte wurden zum Trocknen lichtgeschützt bei Raumtemperatur in eine Präparatmappe gelegt und bei 4 °C gelagert. Nachfolgend wurde die Apoptose mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt (2.6).

2.6. Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der gefärbten Tumorschnitte erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Die Auswertung der aufgezeichneten Lichtintensität der immunhistochemischen Färbungen wurde mit einem Bildbearbeitungsprogramm durchgeführt. Das System arbeitet mit drei verschiedenen Filtersystemen.

Zur Auswertung der Färbungen wurde in einem ersten Schritt die optimale Belichtungszeit und Belichtungsstärke eingestellt. Nachfolgend wurde der Tumorschnitt von dem System meanderförmig abgetastet. Hierzu wurde ein Startpunkt, die Anzahl der Aufnahmen pro Zeile und die Anzahl der Zeilen

festgelegt. Nach der Festlegung begann das System mit der automatischen Abtastung.

In einem weiteren Schritt wurde mit dem Computerprogramm die Fläche des Proliferations-, Angiogenese- bzw. Apoptosesignals und die jeweilige Fläche des Kernsignals (DAPI-Färbung) ermittelt. Nachfolgend wurde der Quotient aus der Fläche des zu bestimmenden Markers und aus der Fläche des jeweiligen Kernsignals gebildet. Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mittels Excel XP.

2.7. Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel XP erfasst und aufgearbeitet. Für die Analyse der Daten wurden Standardabweichung und Standardfehler sowie Mittelwerte errechnet. Um einen Vergleich der Messgrößen der einzelnen Gruppen darstellen zu können, wurden die Daten mit einem t-Test (unabhängig) analysiert und signifikante Werte ($p < 0,05$) in den Abbildungen dieser Arbeit mit einem „★“ gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Effekt einer perkutanen Photonenbestrahlung auf subkutan implantierte A549-Tumoren im Xenograftmodell

3.1.1. Nachweis des Bestrahlungseffektes

Zur Überprüfung des Bestrahlungseffekts auf die Tumoren wurden zwei Versuchsreihen mit unterschiedlichen Gesamtdosen im Mausmodell durchgeführt (2.4.1). Beide Versuchsreihen erfolgten mit zwei Versuchsgruppen mit jeweils fünf Mäusen [17]. Eine Gruppe von Tieren (Gruppe 1) stellte dabei jeweils die Kontrollgruppe dar, die zweite Gruppe (Gruppe 2) wurde bestrahlt. Die Bestrahlung wurde nach erfolgreicher Tumorerzeugung begonnen. Der Versuch endete mit der Tötung der Tiere 48 h nach der letzten Bestrahlung.

Alle Werte in Kapitel 3 sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Versuch 1:

Versuch 1 galt der Überprüfung der Wirkung der eingesetzten Bestrahlungsparameter auf die Tumoren. In der Behandlungsgruppe (Gruppe 2) erhielten fünf Tiere eine einmalige Bestrahlung der Tumoren mit einer Dosis von 2,0 Gy (Tabelle 3).

Die Bestrahlung wurde nach erfolgreicher Tumorerzeugung begonnen. In der Kontrollgruppe war das Wachstumsverhalten unbeeinflusst. Das Tumorstadium stagnierte in der bestrahlten Gruppe direkt nach der Bestrahlung. Die Volumenreduktion war jedoch nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 6, Tag 46). In Bezug auf das Ausgangstumorstadium bei Bestrahlungsbeginn betrug die relative Volumenreduktion 3% nach zwei Tagen.

Tabelle 3: Gruppeneinteilung (n=5) des Versuchs zur Prüfung der Bestrahlungswirkung auf subkutane (s.c.) Tumoren im Mausmodell nach Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy

Tumorzellen	Tumorim-plantation	Therapie-regime	Einzel-dosis [Gy]	Gesamt-dosis [Gy]	Anzahl der Fraktionen
A549	s.c. (n=10)	Kontrolle (n=5)	0	0	0
		Bestrahlung (n=5)	2,0	2,0	1

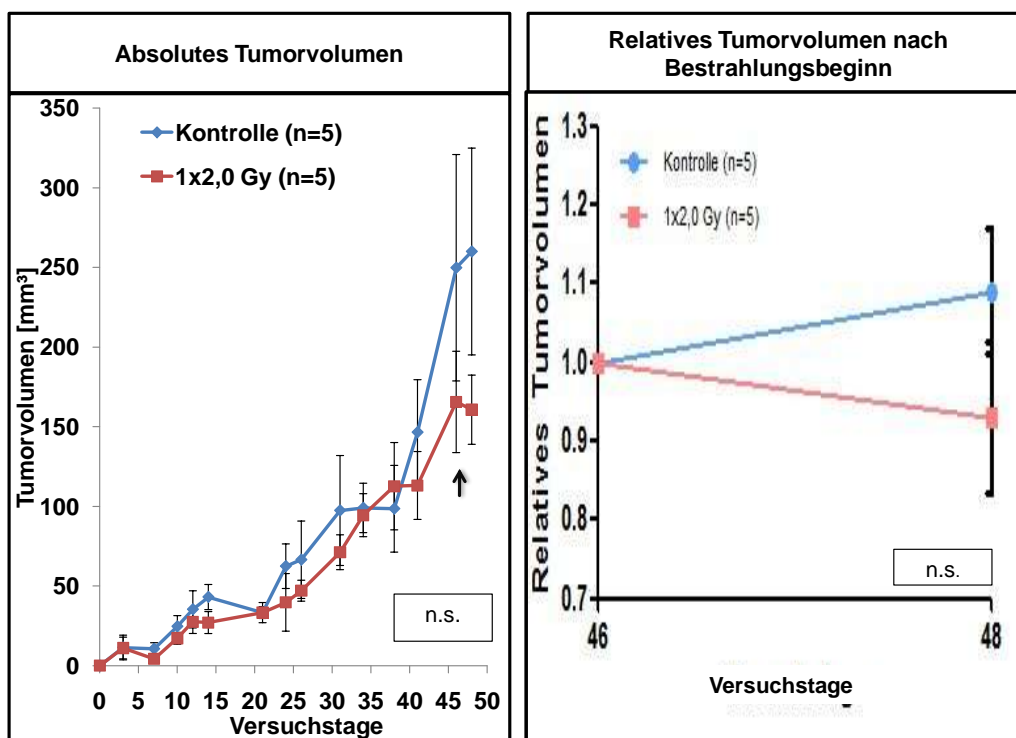


Abbildung 6: Tumorvolumen der A549-Tumoren nach Bestrahlung (→) mit 1 x 2,0 Gy

Links: Absolutes Tumorvolumen der Kontrollgruppe (blau, n=5) und der mit 1 x 2,0 Gy bestrahlten Gruppe (rot, n=5). Die Bestrahlung erfolgte nach erfolgreicher Tumorerzeugung (→). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (n.s.).

Rechts: Relatives Tumorvolumen in Bezug auf das Tumorvolumen bei Bestrahlungsbeginn. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden (n.s.).

Versuch 2:

In Versuch 2 wurde das Wachstumsverhalten der Tumoren unter fraktionierter Bestrahlung untersucht. Dazu wurden in der Behandlungsgruppe (Gruppe 2) fünf Tiere über einen Zeitraum von drei Wochen jeweils zweimal pro Woche mit einer Einzeldosis von 1,8 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 10,8 Gy bestrahlt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Gruppeneinteilung (n=5) des Versuchs zur Prüfung der Bestrahlung mit 6 x 1,8 Gy auf Tumoren im Mausmodell

Tumorzellen	Tumor-implantation	Therapie-regime	Einzeldosis [Gy]	Gesamtdosis [Gy]	Anzahl der Fraktionen
A549	s.c. (n=10)	Kontrolle (n=5)	0	0	0
		Bestrahlung (n=5)	1,8	10,8	6

Die Bestrahlung wurde nach erfolgreicher Tumorerzeugung begonnen. Das Volumen der Tumoren in der Kontrollgruppe nahm exponentiell zu. Bei der bestrahlten Gruppe kam es zu einer Reduktion des Tumolvolumens, die in dem Versuchszeitraum signifikant ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe war (Abbildung 7). In Bezug auf das Ausgangstumolvolumen bei Einleitung der Bestrahlung betrug die relative Volumenreduktion 23 Tage nach Therapiebeginn 53%.

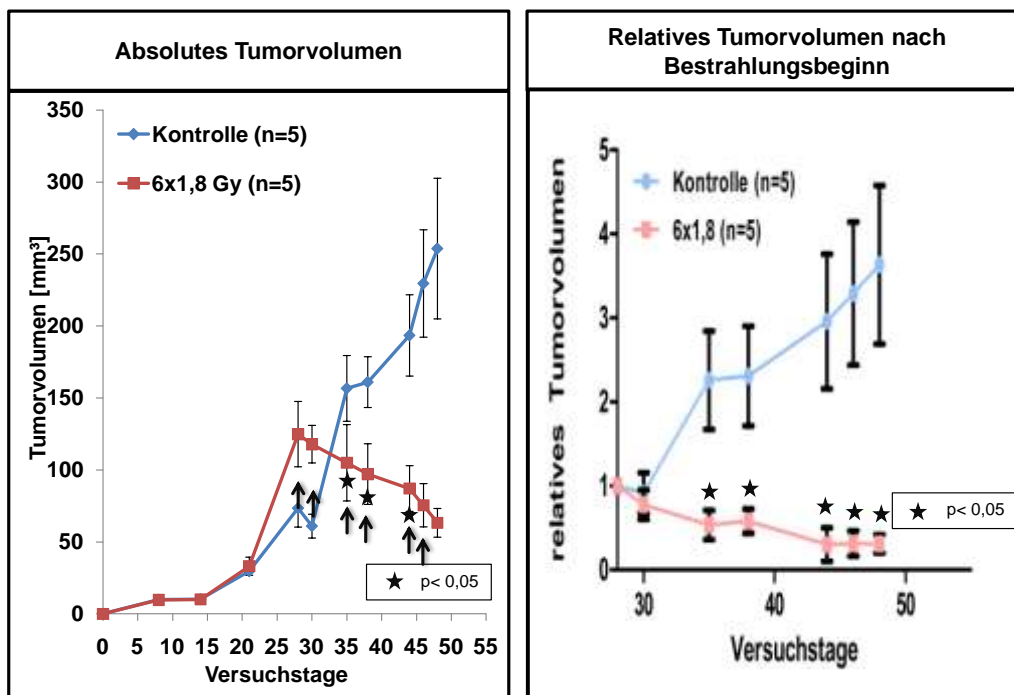


Abbildung 7: Tumorvolumen von A549 Tumoren nach fraktionierter Bestrahlung (→) mit 6 x 1,8 Gy

Links: Absolutes Tumorvolumen in der Kontrollgruppe (blau, n=5) und in der mit 6 x 1,8 Gy bestrahlten Gruppe (rot, n=5). Die Bestrahlungen fanden ab Tag 27 nach Tumorerzeugung statt (→). Die Reduktion des Tumorvolumens in der bestrahlten Gruppe war statistisch signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe.

Rechts: Relatives Tumorvolumen in Bezug auf das Tumorvolumen bei Bestrahlungsbeginn ($p < 0,05$).

3.1.2. Histologische Untersuchungen nach Bestrahlung von A549-Tumoren mit 1 x 2,0 Gy oder 6 x 1,8 Gy

3.1.2.1. Untersuchung der Auswirkung der Bestrahlung auf das Tumorgewebe

Die Abnahme des Tumorvolumens nach Bestrahlung zeigte sich auch in den histologischen Untersuchungen. Nach einer Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy war die Tumorfläche relativ zur Tumorfläche der Kontrollgruppe um 40,25% ($p = 0,08$) sowie nach einer Bestrahlung mit 6 x 1,8 Gy um 53,84% ($p = 0,04$) reduziert.

Mittels DAPI (Kernfärbung) wurden vitale Tumoranteile immunhistochemisch markiert und in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt (Abbildung 10). Das vitale, signalintensive Tumorgewebe war nach Bestrahlung vermindert, während bei den unbehandelten Tumoren größere Anteile des Tumors vital waren. Bei den Tumoren, die mit 1 x 2,0 Gy bestrahlt wurden, kam es in Bezug zur Kontrollgruppe zu einer Reduktion des vitalen Gewebes um 53,79%. Bei den mit 6 x 1,8 Gy bestrahlten Tumoren betrug die Reduktion 57,30 % (Abbildung 8, links). Die Abnahme des vitalen Tumorgewebes nach nicht fraktionierter und nach fraktionierter Bestrahlung war signifikant ($p=0,04$ für 1 x 2,0 Gy; $p=0,03$ für 6 x 1,8 Gy).

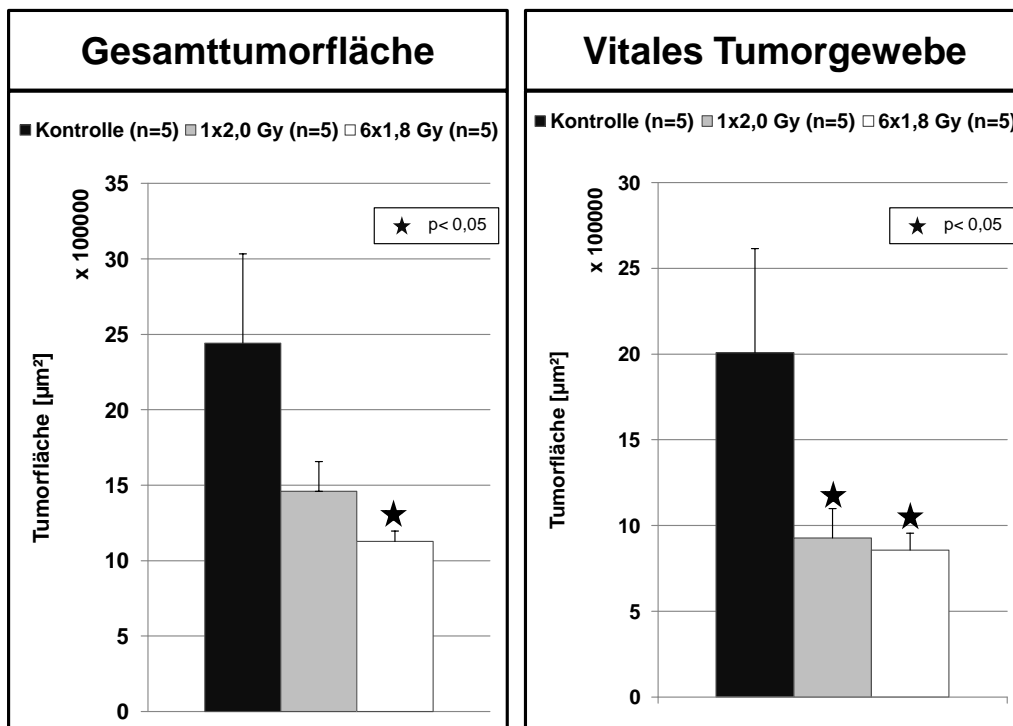


Abbildung 8: Gesamttumorfleichen und Fläche des vitalen Tumorgewebes nach Bestrahlung.

Links: Gesamte Tumorfleichen (nach computergestützter Erfassung und Auswertung) der Kontrollgruppe (schwarz, n=5), der Gruppe der Tiere, die mit 1 x 2,0 Gy (grau, n=5, $p=0,08$) und der Gruppe der Tiere, die mit 6 x 1,8 Gy (weiß, n=5, $p=0,04$) bestrahlt wurden.

Rechts: Fläche des vitalen Tumorgewebes in der Kontrollgruppe (schwarz, n=5), der Gruppe der Tiere, die mit 1 x 2,0 Gy (grau, n=5, $p=0,04$) und der Gruppe der Tiere, die mit 6 x 1,8 Gy (weiß, n=5, $p=0,04$) bestrahlt wurden.

Bereiche der histologischen Schnitte ohne Signal wurden als nicht vitales (nekrotisches) Gewebe gewertet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 9, links) waren nach Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy 22,4% ($p=0,2$) größere Tumorareale ohne vitales Signal. Bei den mit 6 x 1,8 Gy bestrahlten Tumoren kam es zu einer Reduktion der nekrotischen Bereiche um 62,18% ($p=0,1$) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Setzt man die Tumorfläche der signalreichen, vitalen Tumoranteile (Kernfärbung) ins Verhältnis zu den Flächen ohne Signal (nekrotische Bereiche), wird deutlich, dass in den Tumoren, die mit 1 x 2,0 Gy bestrahlt wurden, die nekrotischen Tumorareale am stärksten zunahmen (Abbildung 9, rechts). Bei dieser Gruppe fand sich eine Zunahme des prozentualen Anteils an nekrotischem Gewebe in Bezug auf signalreiches vitales Gewebe um 15,66% ($p=0,04$). Der prozentuale Anteil nekrotischen Gewebes in Bezug auf vitales Gewebe war in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der mit 6 x 1,8 Gy bestrahlten Tiere vergleichbar. Es kam zu einer Zunahme des prozentualen Anteils um 2,26%. ($p=0,4$).

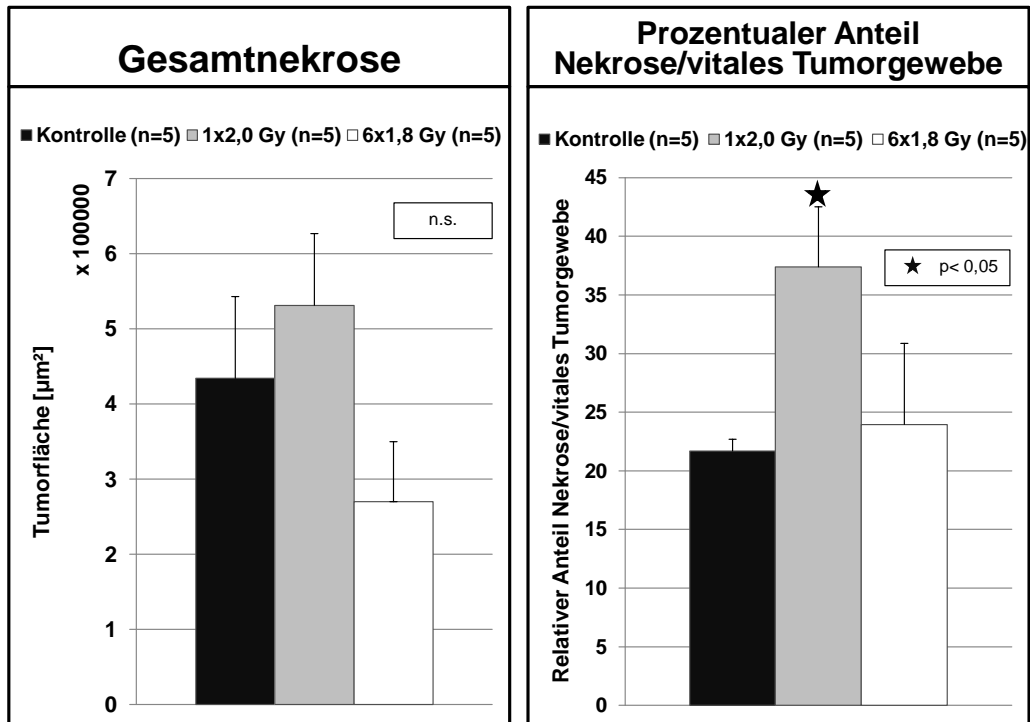


Abbildung 9: Nekrotische Tumorfläche und Verhältnis zwischen vitalen Tumorarealen und nekrotische Tumorarealen bei bestrahlten und nicht bestrahlten

Links: Gesamte nekrotische Tumorfläche (nach computergestützter Erfassung und Auswertung) der Kontrollgruppe (schwarz, n=5), der Gruppe der Tiere, die mit 1 x 2,0 Gy (grau, n=5, p=0,2) und der Gruppe der Tiere, die mit 6 x 1,8 Gy (weiß, n=5, p=0,1) bestrahlt wurden.

Rechts: Prozentuales Verhältnis zwischen vitalen Tumorarealen und nekrotischen Tumorarealen in der Kontrollgruppe (schwarz, n=5), der Gruppe der Tiere, die mit 1 x 2,0 Gy (grau, n=5, p=0,04) und der Gruppe der Tiere, die mit 6 x 1,8 Gy (weiß, n=5, p=0,4) bestrahlt wurden.

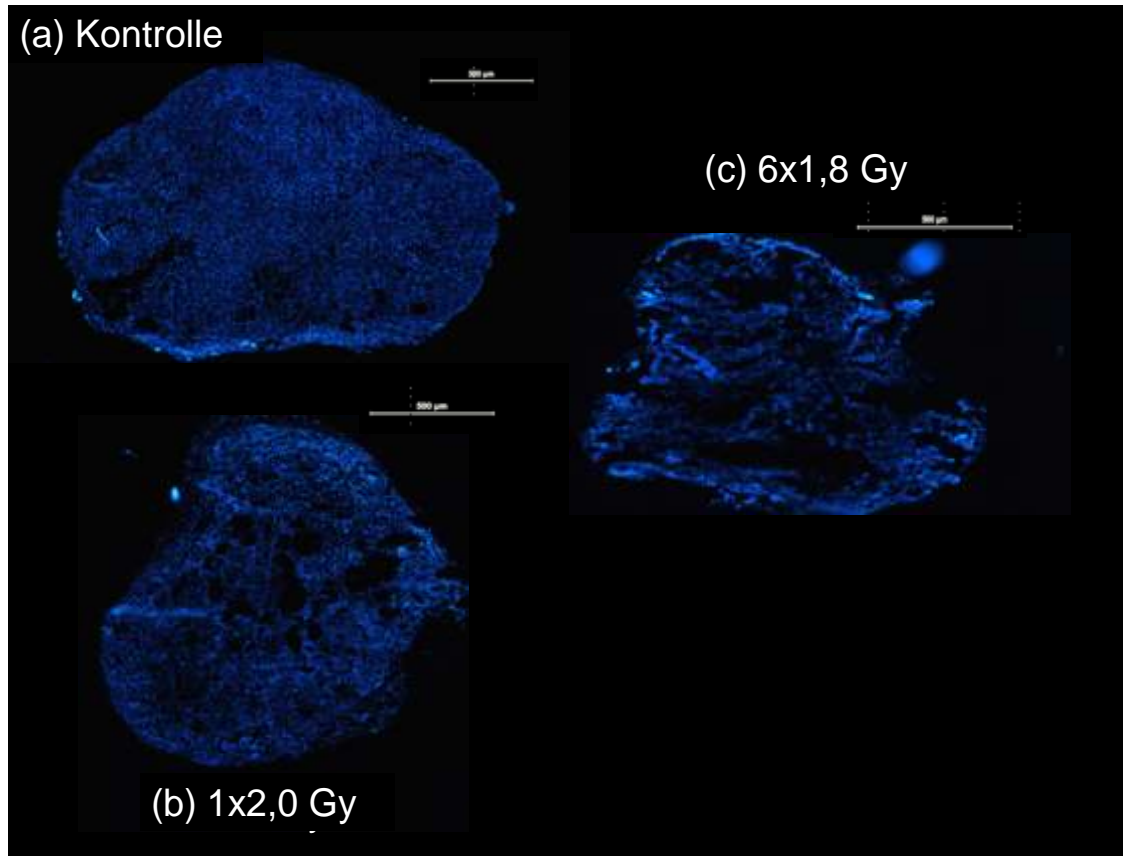


Abbildung 10: Repräsentative immunhistologische Darstellung der Kernfärbung mittels DAPI bei subkutan liegenden A549 Tumoren

Histologische Tumorschnitte nach immunhistochemischer Färbung mit DAPI. Die Tumoren wurden nicht bestrahlt (a), mit einer Dosis von 1 x 2,0 Gy (b) oder 6 x 1,8 Gy (c) bestrahlt.

3.1.2.2. Apoptoserate in A549-Tumoren nach Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy oder 6 x 1,8 Gy

Zur weiteren Untersuchung des Bestrahlungseffekts auf die Tumoren wurde die Apoptose mittels Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt. Hierzu wurde in den Tumoren die Caspase-3 markiert (Abbildung 11). Nach immunfluoreszenzmikroskopischer Darstellung und computergestützter Auswertung wurden Fotos der Tumoren angefertigt und zudem das emittierte Signal gemessen, sowie der Quotient aus den Signalen der Caspase-3 und Kernfärbung gebildet und graphisch dargestellt (Abbildung 12).

Die meisten Signale fanden sich auf den histologischen Bildern der Tumoren, die mit 1 x 2,0 Gy bestrahlt wurden. Die signalgebenden Areale lagen sowohl in der Peripherie als auch im Tumorzentrum. Ein ähnliches Bild boten die

histologischen Schnitte der mit 6 x 1,8 Gy bestrahlten Tumoren. Die Signalintensität war in der Kontrollgruppe nur gering (Abbildung 11).

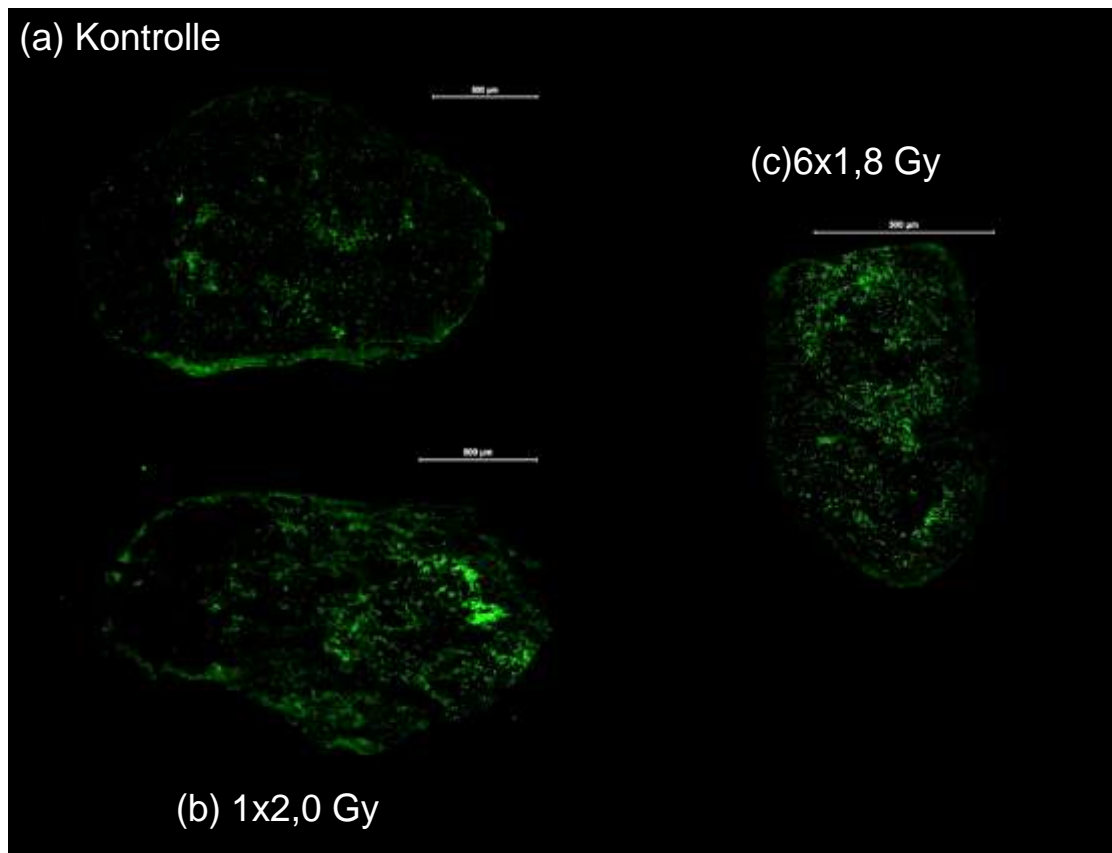


Abbildung 11: Repräsentative immunhistologische Darstellung der Apoptose mittels Caspase-3-Färbung bei subkutan transplantierten A549-Tumoren

Histologische Tumorschnitte nach immunhistochemischer Färbung mit einem Marker für Caspase-3. Die Tumoren wurden nicht bestrahlt (a), mit einer Dosis von 1 x 2,0 Gy (b) oder mit 6 x 1,8 Gy (c) bestrahlt.

Die graphische Auswertung der Signalintensität der jeweiligen Versuchsgruppen war im Ergebnis entsprechend (Abbildung 12). Die Signale der Caspase-3 Färbung waren in den mit 1 x 2,0 Gy bestrahlten Tumoren am stärksten. Die Signalintensität nahm im Vergleich zur Kontrollgruppe um 13,04% ($p=0,07$) zu. Nach Bestrahlung mit 6 x 1,8 Gy nahm die Signalintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe um 8% ($p=0,2$) zu. Die geringsten Werte der Caspase-3-Signale in Bezug auf die Kernfärbung fanden sich in der Kontrollgruppe.

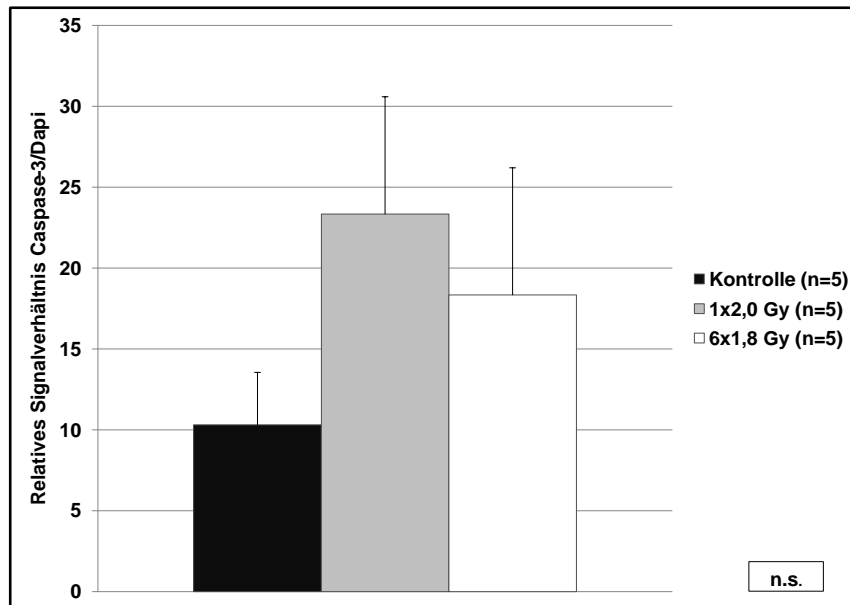


Abbildung 12: Verhältnis der Signalstärke von Caspase-3 und der DAPI-Färbung in nicht bestrahlten und bestrahlten A549-Tumoren

Verhältnis des fluoreszenzmikroskopischen Caspase-3-Signals und des Signals zur Kernfärbung (DAPI-Färbung) nach immunhistochemischer Färbung in der Kontrollgruppe (schwarz, n=5), der Gruppe der Tiere, die mit 1 x 2,0 Gy (grau, n=5, p=0,07) und der Gruppe der Tiere, die mit 6 x 1,8 Gy (weiß, n=5, p=0,2) bestrahlt wurden.

3.1.2.3. Angiogeneserate in A549-Tumoren nach Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy oder 6 x 1,8 Gy

Für die Untersuchung des Bestrahlungseffekts auf die Angiogenese wurden die Tumoren immunhistochemisch mit dem Angiogenesemarker CD31 markiert. Mit den Tumoren der Kontrollgruppe wurde in gleicher Weise verfahren (Abbildung 13). Nach immunfluoreszenzmikroskopischer Darstellung und computergestützter Auswertung wurden Fotos der Tumoren angefertigt, die emittierten Signale gemessen und der Quotient aus den Signalen der Angiogenese und Kernfärbung gebildet und graphisch dargestellt (Abbildung 14).

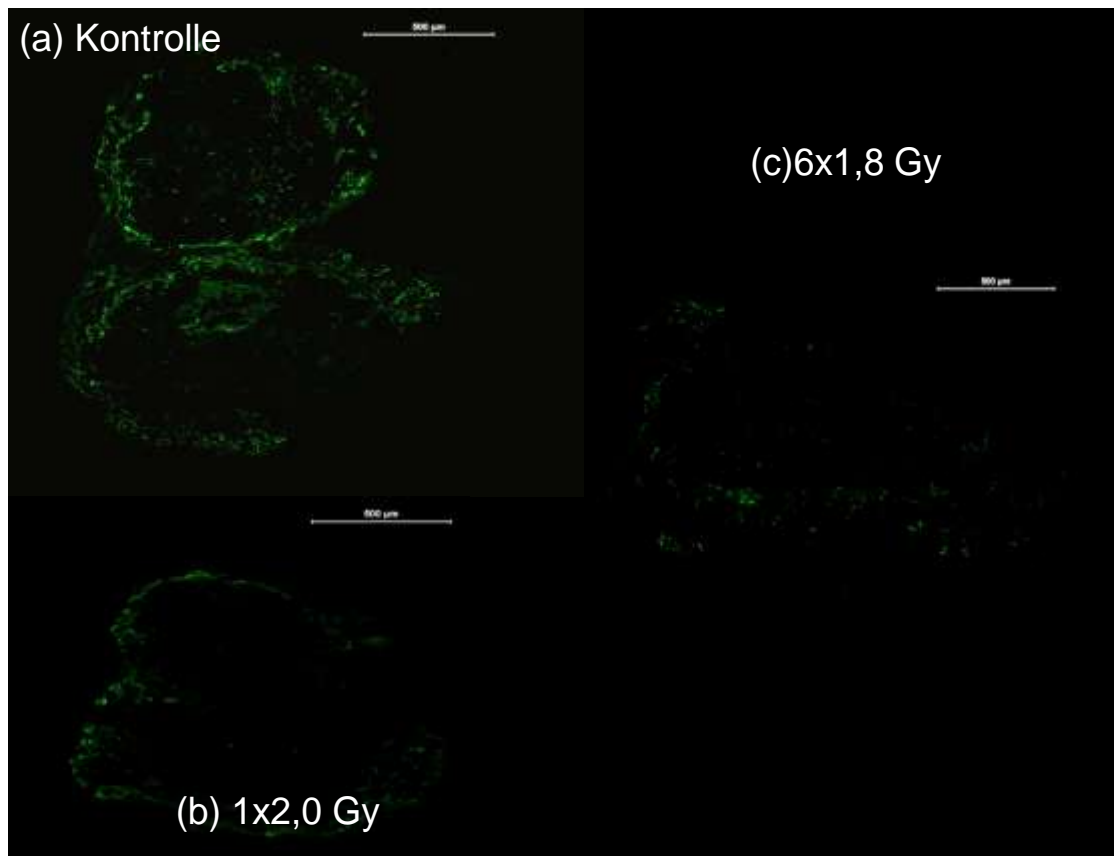


Abbildung 13: Repräsentative immunhistologische Darstellung der Angiogenese mittels CD31 bei A549-Tumoren

Histologische Tumorschnitte nach immunhistochemischer Färbung mit einem Marker für CD31. Die Tumoren wurden nicht bestrahlt (a), mit einer Dosis von 1 x 2,0 Gy (b) oder mit 6 x 1,8 Gy (c) bestrahlt.

Bei Tumoren der Kontrollgruppe waren sowohl in der Peripherie als auch im Tumorzentrum CD31-Signale vorhanden. Nach einer Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy waren große Tumoreareale signalarm. Im Randbereich waren teilweise CD31-Signale vorhanden. Nach Bestrahlung mit einer Dosis von 6 x 1,8 Gy fanden sich Areale, in denen das CD31-Signal vollkommen fehlte.

Die graphische Auswertung der Signalintensität der jeweiligen Versuchsgruppen zeigte ein vergleichbares Ergebnis (Abbildung 14). In Bezug zur Kernfärbung war die Kontrollgruppe am signalintensivsten für CD31. Die Signalintensität für CD31 war in den Tumoren der bestrahlten Gruppen (1 x 2,0 Gy bzw. 6 x 1,8 Gy) vergleichbar stark, jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils signifikant verringert ($p=0,02$ für 1 x 2,0 Gy; $p=0,03$ für 6 x 1,8 Gy). Bei der Gruppe der mit 1 x 2,0 Gy bestrahlten Tiere nahm die

Signalintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe um 16,96% ab. Bei der Gruppe der mit 6 x 1,8 Gy bestrahlten Tiere war das Signal um 13,37% reduziert.

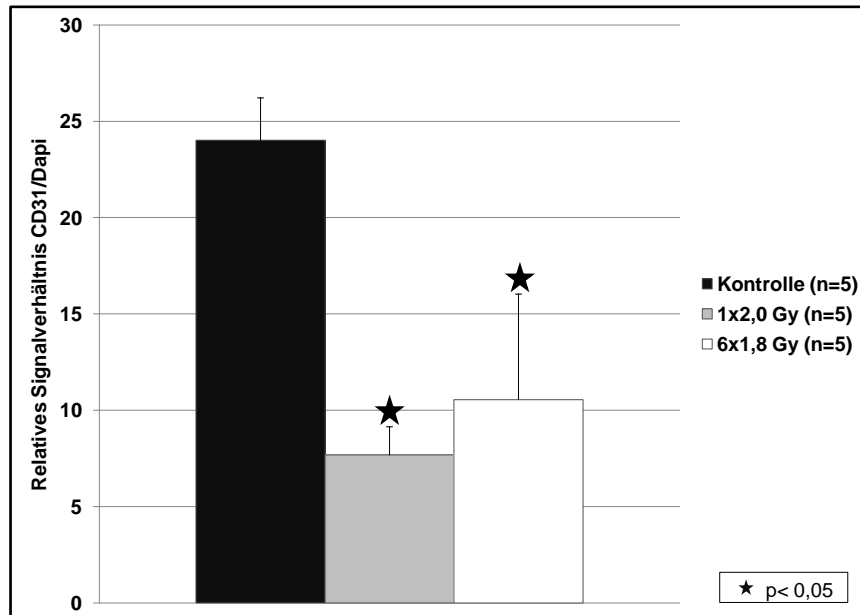


Abbildung 14: Verhältnis der Signalstärke von CD31 zur DAPI-Färbung in nicht bestrahlten und bestrahlten A549-Tumoren

Verhältnis des fluoreszenzmikroskopischen CD31-Signals und des Signals zur Kernfärbung (DAPI-Färbung) nach immunhistochemischer Färbung in der Kontrollgruppe (schwarz, n=5), die Gruppe der Tiere, die mit 1 x 2,0 Gy (grau, n=5, p=0,02) und mit 6 x 1,8 Gy (weiß, n=5, p=0,03) bestrahlt wurden.

3.1.2.4. Proliferationsrate in A549-Tumoren nach Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy oder 6 x 1,8 Gy

Für die histologische Darstellung des Bestrahlungseffekts auf die Proliferationsrate wurden die Tumoren immunhistochemisch mit dem Proliferationsmarker Ki67 markiert (Abbildung 15).

Nach immunfluoreszenzmikroskopischer Darstellung und computergestützter Auswertung wurden Aufnahmen der Tumoren angefertigt und die emittierten Signale gemessen, der Quotient aus den Signalen der Proliferation und der Kernfärbung gebildet und graphisch dargestellt (Abbildung 16).

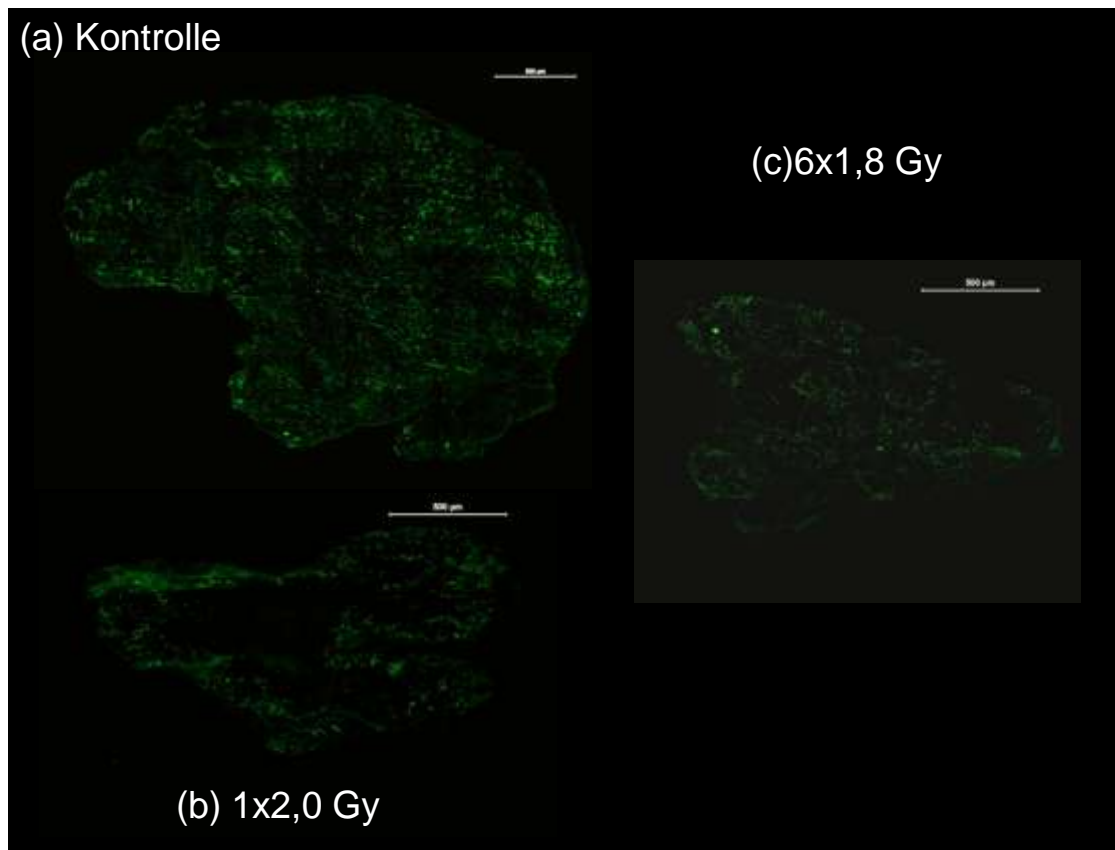


Abbildung 15: Repräsentative immunhistologische Darstellung der Proliferation mittels Ki67 bei A549-Tumoren

Das histologische Bild zeigt Tumorschnitte nach immunohistochemischer Färbung mit einem Marker für Ki67. Die Tumoren wurden nicht bestrahlt (a), mit einer Dosis von 1 x 2,0 Gy (b) oder mit 6 x 1,8 Gy (c) bestrahlt.

In den fluoreszenzmikroskopischen Bildern waren die Signale für die Proliferationsrate der Kontrolltumoren homogen verteilt. Bei den Tumoren der bestrahlten Gruppen (1 x 2,0 Gy bzw. 6 x 1,8 Gy) waren die signalgebenden Bereiche nicht homogen im Tumor verteilt und im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Signale insgesamt schwächer.

Das Verhältnis der Signalintensität des Ki67-Signals und des DAPI-Signals war bei den Tumoren in der Kontrollgruppe am stärksten ausgeprägt. Bei den bestrahlten Tumoren war das Verhältnis des Ki67-Signals zum DAPI-Signal signifikant schwächer als in der Kontrollgruppe ($p=0,01$ für 1 x 2,0 Gy; $p=0,04$ für 6 x 1,8 Gy). Das Signalverhältnis von Ki67 zu DAPI war in der Gruppe der mit 1 x 2,0 Gy bestrahlten Tiere am schwächsten. Die Signalintensität dieser Gruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe um 18,83% reduziert. In der

Gruppe der Tiere, die mit 6 x 1,8 Gy bestrahlt wurden, betrug die Reduktion der Signalintensität 10,75%.

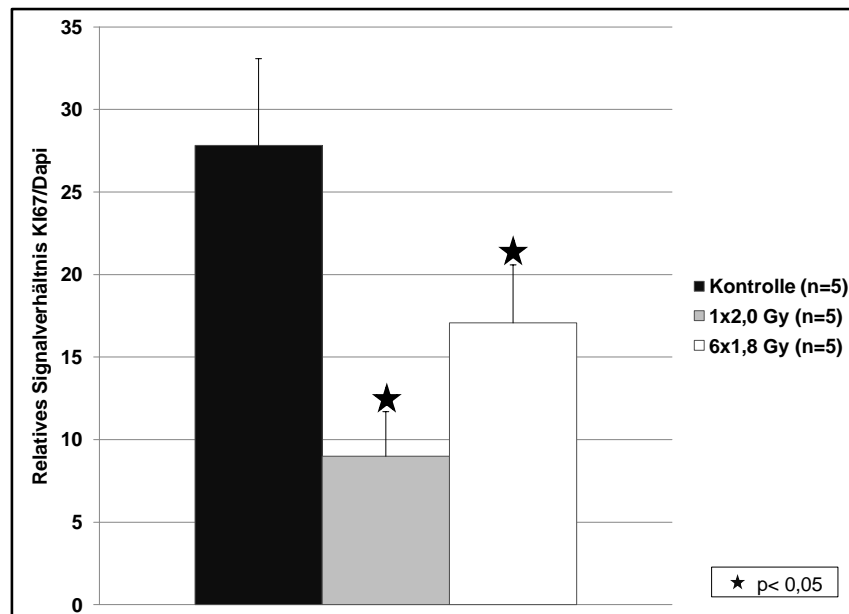


Abbildung 16: Verhältnis der Signalstärke von Ki67 und der DAPI-Färbung in nicht bestrahlten und bestrahlten A549-Tumoren.

Verhältnis des fluoreszenzmikroskopischen Ki67-Signals und des Signals zur Kernfärbung (DAPI-Färbung) nach immunhistochemischer Färbung in der Kontrollgruppe (schwarz, n=5), der Gruppe der Tiere, die mit 1 x 2,0 Gy (grau, n=5, p=0,01) und der Gruppe der Tiere, die mit 6 x 1,8 Gy (weiß, n=5, p=0,04) bestrahlt wurden.

3.2. MRT-Perfusionsdarstellung von subkutan transplantierten A549-Tumoren

Zur Darstellung der Perfusionsverhältnisse in den Tumoren im *in vivo* Modell wurden MRT-Perfusionsmessungen zunächst an unbehandelten Tumoren durchgeführt. Die Messung der Perfusionseigenschaften der Tumoren zeigte, dass Unterschiede zwischen Tumorzentrum und Tumorperipherie bestanden. Das verabreichte Kontrastmittel reicherte sich stärker in der Peripherie als im Tumorzentrum an (Abbildung 17). Die Tumorperipherie war somit stärker vaskularisiert als das Tumorzentrum.

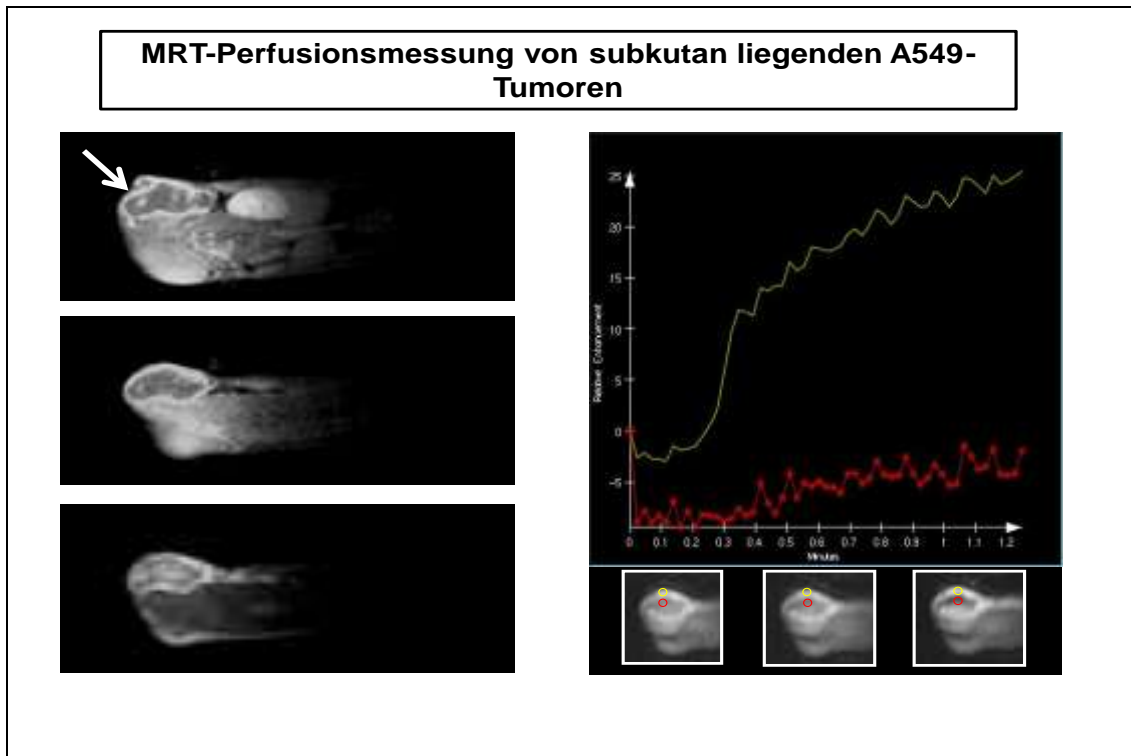


Abbildung 17: MRT Perfusionsmessung der Anflutung des Kontrastmittels im Zentrum bzw. in der Peripherie der A549 Tumoren

Links: MRT-Aufnahmen einer CD1 nu/nu Maus. Es sind drei Schnitte der MRT-Bilder am Tumorgrund, in der Mitte des Tumors und am Tumordach zu sehen. Am Tumorrand (→) bildete sich ein heller Kontrastmittelsaum, der für eine gute Durchblutung des Tumors in diesem Bereich spricht. Das Tumorzentrum stellte sich mit verminderter Kontrastmittelanreicherung dar.

Rechts: Perfusionsmessung nach Injektion des Kontrastmittels. In der Tumorpherie starke und schnelle Kontrastmittelanflutung (gelb), während es im Tumorzentrum zu einer langsameren und geringeren Anflutung kommt (rot).

3.3. Differenzierung des Effekts einer alleinigen Bestrahlung, einer Inhibition der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1alpha oder HIF-2alpha oder deren Kombination

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zur Prüfung der HIF induzierten Erhöhung der Resistenz der Tumoren auf Photonenstrahlung die folgenden drei Versuchsreihen durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist im Kapitel 2.4.2 beschrieben.

3.3.1. Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren durch alleinige Bestrahlung

Zur Differenzierung des Einflusses der Bestrahlung von kombinierten Effekten auf die Wachstumsverzögerung der Tumore wurden die Tiere in Versuchsgruppe 1 (n=5) mit 2 x 1,8 Gy an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bestrahlt und in Versuchsgruppe 2 (n=5) mit 3 x 1,8 Gy an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestrahlt (Tabelle 5). Tiere in der Kontrollgruppe (n=5) wurden nicht behandelt.

Tabelle 5: Gruppeneinteilung (n=5) zur Überprüfung der Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren im Mausmodell nach einer fraktionierten Bestrahlung mit unterschiedlichen Gesamtdosen

Tumorzellen	Tumor-implantation	Therapie-regime	Einzeldosis [Gy]	Gesamtdosis [Gy]	Anzahl der Fraktionen
A549	subkutan (n=15)	Kontrolle (n=5)	0	0	0
		Bestrahlung (n=5)	1,8	3,6	2
		Bestrahlung (n=5)	1,8	5,4	3

Die Wachstumskurve der Tumoren nach Bestrahlung mit 2 x 1,8 Gy zeigte einen verzögerten und nahezu parallelen Verlauf zur Kontrollgruppe. Nach Bestrahlung mit 3 x 1,8 Gy war das Wachstum bis zum Tag 25 deutlich verlangsamt (Abbildung 18).

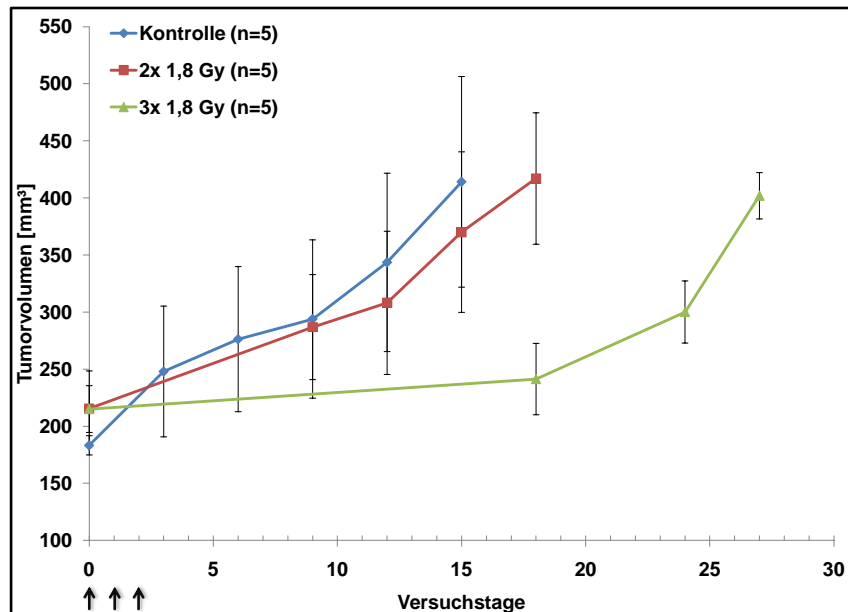


Abbildung 18: Wachstumsverhalten von A549-Tumoren nach Bestrahlung (→) mit unterschiedlicher Gesamtdosis

Wachstumskurven der Kontrollgruppe (blau, n=5), der Gruppe der mit 2 x 1,8 Gy (rot, n=5) und der mit 3 x 1,8 Gy (grün, n=5) bestrahlten Tiere. Die Bestrahlung (→) fand nach Erreichen des Tumorstartvolumens statt. Nach Erreichen des Tumorendvolumens von 400 mm³ wurde der Versuch beendet.

Aus diesen Daten wurde im Weiteren die Wachstumsverzögerung errechnet (Abbildung 19). Die Wachstumsverzögerung war bei den Tumoren, die mit 3 x 1,8 Gy bestrahlt wurden, in Bezug auf die Kontrollgruppe am stärksten. Die Zeit, die die Tumoren dieser Gruppe brauchten, um auf ein Volumen von 400 mm³ zu wachsen, war nahezu zweimal länger als die Zeit, die die Tumoren in der Kontrollgruppe benötigten. Die Kontrollgruppe erreichte im Mittel nach 15 Tagen das Tumorendvolumen von 400 mm³. Die mit 3 x 1,8 Gy bestrahlten Tumore erreichten dieses Volumen im Mittel nach 29 Tagen. Das Wachstum der Tumoren nach Bestrahlung mit 2 x 1,8 Gy war im Mittel um neun Tage verzögert, bevor das Tumorendvolumen erreicht wurde.

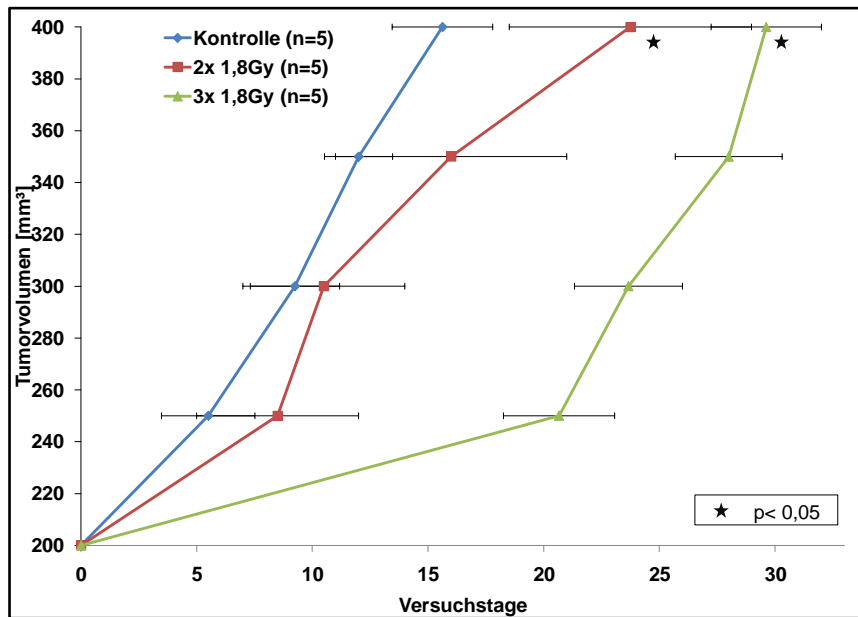


Abbildung 19: Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren nach Bestrahlung mit unterschiedlicher Gesamtdosis

Wachstumsverzögerung der Kontrollgruppe (blau, n=5), der Gruppe der mit 2 x 1,8 Gy (rot, n=5) und der mit 3 x 1,8 Gy bestrahlten Tiere (grün, n=5). Nach Erreichen des Tumorstartvolumens (200 mm³ (\pm 10%)) wurde die Bestrahlung begonnen. Der Versuch wurde nach dem Erreichen des Tumorendvolumens von 400 mm³ beendet. Das Wachstum war in beiden Bestrahlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verzögert ($p < 0,05$).

Die rechnerische Ermittlung der Wachstumsverzögerung der behandelten Versuchsgruppe ergab eine absolute Wachstumsverzögerung von 8,37 Tagen für die Gruppe der mit 2 x 1,8 Gy bestrahlten Tiere. Für die Gruppe der mit 3 x 1,8 Gy bestrahlten Tiere betrug die absolute Wachstumsverzögerung 13,87 Tage (Tabelle 6).

Tabelle 6: Errechnete absolute Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren nach Bestrahlung mit unterschiedlicher Gesamtdosis

	Tage bis zum Erreichen des Endpunkts [d]	Absolute Wachstumsverzögerung [d]	Signifikanz
Kontrolle	15,63 (+/-2,17)		
2x1,8 Gy	24 (+/- 5,2)	8,37	(p=0,03)
3x1,8 Gy	29,5 (+/- 2,75)	13,87	(p=0,008)

Zeit in Tagen, in der die Tumoren vom Startpunkt des Versuchs (Tumorzusatz von 200 mm³ (+/- 10%)) das vorgegebene Tumorendvolumen (Tumorzusatz: 400 mm³) erreichten. Es werden die Wachstumsverzögerungen der Kontrollgruppe (schwarz, n=5), der Gruppe der Tiere, die mit 2 x 1,8 Gy (rot, n=5, p=0,03) und mit 3 x 1,8 Gy (grün, n=5, p=0,008) bestrahlt wurden, gezeigt.

3.3.2. Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren unter alleiniger siRNA-Injektion gegen HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha

Zur Prüfung der Wirkung der spezifischen siRNAs gegen HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha wurden Versuche zur absoluten und relativen Wachstumsverzögerung durchgeführt (2.4.2). Die Anzahl der Versuchstiere pro Versuchsgruppe betrug 5 Tiere (Tabelle 7). Tieren in den Versuchsgruppen wurde jeweils entweder siRNA gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha oder eine nicht spezifische randomisierte siRNA (siRNA-Random) appliziert (2.2.1). Die unspezifische siRNA hatte keine Sequenzübereinstimmung bei Überprüfung gegen bekannte Sequenzen der Human- und Maus-Datenbank. Die Injektion der siRNA wurde an den Tagen 0 und 3 nach Erreichen des Tumorzusatzvolumens von 200mm³ (+/- 10%) durchgeführt. Tiere in der Kontrollgruppe erhielten keine Behandlung.

Tabelle 7: Gruppeneinteilung zur Überprüfung der Wachstumsverzögerung von A549 Tumoren nach Injektion von siRNA gegen HIF-1alpha (n=5) oder HIF 2alpha (n=5) sowie unspezifischer siRNA Random (n=5).

Tumorzellen	Tumorerzeugung	Therapieregime
A549	subkutan (n=20)	Kontrolle (n=5)
		siRNA-Random (n=5)
		siRNA HIF-1alpha (n=5)
		siRNA HIF-2alpha (n=5)

Nach Applikation der unspezifischen siRNA-Random war das Tumorwachstum gegenüber der Kontrollgruppe nicht verzögert. Tumoren der Kontrollgruppe erreichten im Mittel nach 14 Tagen das Tumorendvolumen, Tumoren der mit siRNA-Random behandelten Tiere nach 15 Tagen.

Eine Injektion der spezifischen siRNAs führte zu einem verzögerten Wachstum in beiden Versuchsgruppen. Tumoren in beiden Gruppen erreichten in einem vergleichbaren Zeitraum das Tumorendvolumen. Die Tumoren der Gruppe, die mit siRNA gegen HIF-1alpha behandelt wurden, erreichten im Mittel nach 22 Tagen das Tumorendvolumen, die Tumoren der Gruppe, die mit siRNA gegen HIF-2alpha behandelt wurden, im Mittel nach 23 Tagen (Abbildung 20).

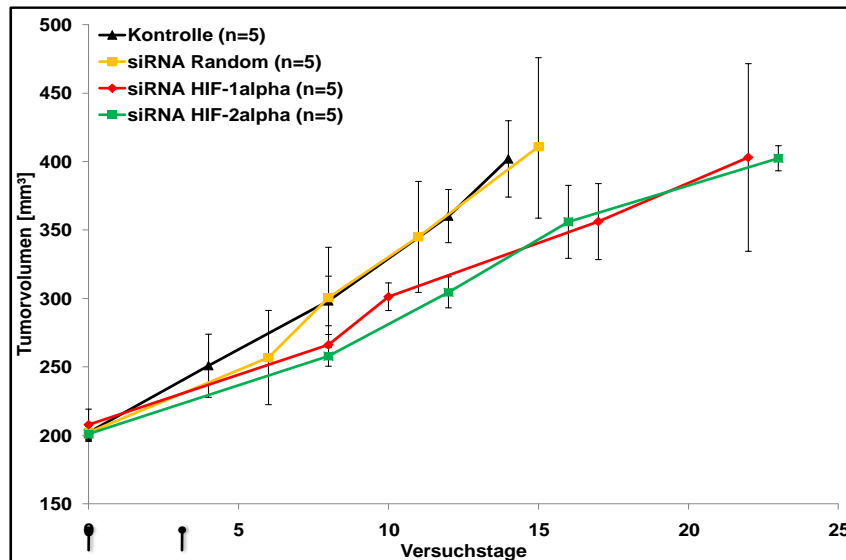


Abbildung 20: Wachstumsverhalten von A549-Tumoren nach Injektion von siRNA-Random oder siRNA gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha

Wachstumskurven der Kontrollgruppe (schwarz, n=5) und der mit siRNA behandelten Versuchsgruppen: siRNA-Random (orange, n=5), siRNA HIF-1alpha (rot, n=5) und siRNA HIF-2alpha (grün, n=5). Die Injektion der jeweiligen siRNA (—●) wurde nach dem Erreichen des Tumorstartvolumens von 200 mm³ (\pm 10%) an den Tagen 0 und 3 durchgeführt. Der Versuch wurde nach Erreichen des Tumorendvolumens von 400 mm³ beendet.

Bei der Betrachtung der Wachstumsverzögerung wurde dieser Effekt deutlicher (Abbildung 21). Tumoren in der Kontrollgruppe und Tumoren in der Gruppe von Tieren, denen siRNA-Random injiziert wurde, benötigten eine nahezu vergleichbare Zeit, um vom Tumorstartvolumen (200 mm³ \pm 10%) auf das Tumorendvolumen (400 mm³) zu wachsen. Die berechnete absolute Wachstumsverzögerung zwischen beiden Gruppen betrug 0,7 Tage (Tabelle 8). Die Tumoren in den Gruppen von Tieren, die mit spezifischer siRNA gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha behandelt wurden, zeigten jeweils ein vergleichbares Bild. Nach Injektion von spezifischer siRNA war das Wachstum gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verzögert ($p=0,024$ für HIF-1alpha; $p=0,039$ für HIF-2alpha). Die absolute Wachstumsverzögerung betrug nach Injektion von siRNA gegen HIF-1alpha verglichen mit der Kontrollgruppe 8,7 Tage und nach Injektion von siRNA gegen HIF-2alpha 6,3 Tage (Tabelle 8).

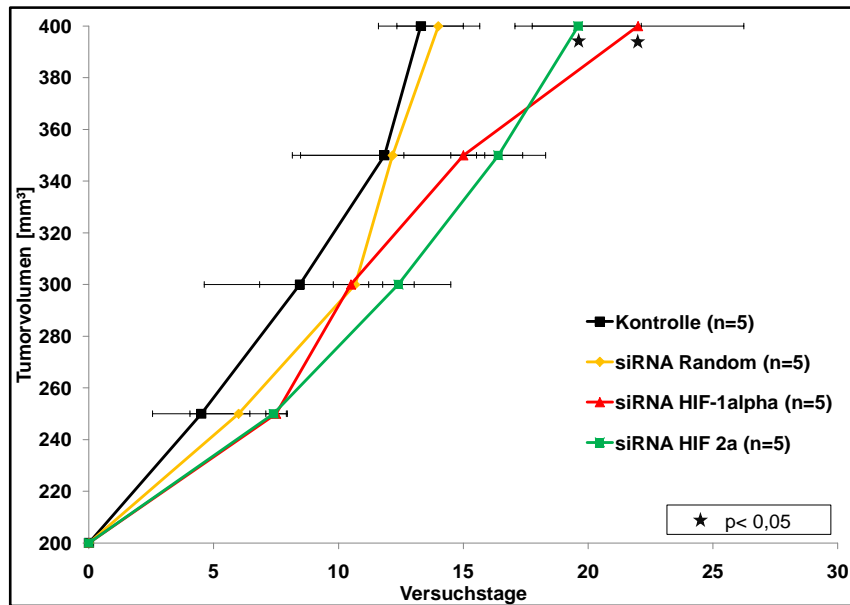


Abbildung 21: Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren nach Injektion von siRNA-Random oder siRNA gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha

Wachstumsverzögerung nach Injektion von unspezifischer (gelb, n=5) oder spezifischer siRNA gegen HIF-1alpha (rot, n=5) und HIF-2alpha (grün, n=5). Darüber hinaus wird die Kontrollgruppe (schwarz, n=5) dargestellt. Bezogen auf die Kontrollgruppe war das Tumorwachstum bei den Tieren, die mit siRNA gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha behandelt wurden, statistisch signifikant verzögert ($p < 0,05$).

Tabelle 8: Absolute Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren nach Injektion von siRNA-Random oder siRNA gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha gegenüber der Kontrollgruppe.

	Tage Endpunkts [d]	Absolute Wachstumsverzögerung [d]	Signifikanz
Kontrolle	13,3 (+/- 1,70)		
siRNA-Random	14 (+/- 1,66)	0,7	(n.s.)
siRNA-HIF1a	22 (+/- 4,24)	8,7	(p=0,024)
siRNA-HIF2a	19,6 (+/- 2,53)	6,3	(p=0,039)

Zeit, in der die Tumoren ausgehend vom Tumorstartvolumen (Tumolvolumen: 200 mm³ (+/- 10%)) das vorgegebene Tumorendvolumen (Tumolvolumen: 400 mm³) erreichten. Die Kontrollgruppe (n=5) und die Gruppe der Tiere, denen eine siRNA-Random (n=5) appliziert wurde, zeigten keinen signifikanten Unterschied im Wachstumsverhalten (n.s.). Das Tumorstadium war nach Injektion spezifischer siRNA signifikant verzögert (HIF-1alpha: rot, n=5, p=0,024; HIF-2alpha: grün, n=5, p=0,039).

3.3.3. Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren durch die Kombination einer Bestrahlung mit einer siRNA-Injektion

Zur Prüfung der Wirkung der spezifischen siRNAs gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha in Kombination mit einer perkutanen Bestrahlung wurden Versuche zur absoluten und relativen Wachstumsverzögerung durch diese Behandlung (2.4.2) durchgeführt.

Hierzu wurde eine Anzahl von sechs Tieren pro Versuchsgruppe gewählt. Insgesamt wurden fünf Versuchsgruppen gebildet. Nach Erreichen des Tumorstartvolumens wurde eine Gruppe ausschließlich mit siRNA-Random behandelt. Drei Versuchsgruppen wurden nach Erreichen des Tumorstartvolumens jeweils mit siRNA gegen HIF-1alpha, HIF-2alpha oder siRNA-Random behandelt und danach zusätzlich bestrahlt (Tabelle 9). Tiere in der Kontrollgruppe wurden nicht behandelt.

Tabelle 9: Gruppeneinteilung (n=6) zur Überprüfung der Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren im Mausmodell nach Injektion von siRNA gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha oder siRNA-Random und Bestrahlung mit jeweils 2 x 1,5 Gy

Tumorzellen	Tumor- erzeugung	Therapie- regime	Einzeldosis [Gy]	Gesamt- dosis [Gy]	Anzahl der Fraktionen
A549	Subkutan (n= 30)	Kontrolle (n=6)	0	0	0
		siRNA- Random (n=6)	0	0	0
		siRNA- Random+ Bestrahlung (n=6)	1,5	3	2
		siRNA HIF-1alpha+ Bestrahlung (n=6)	1,5	3	2
		siRNA HIF-2alpha+ Bestrahlung (n=6)	1,5	3	2

Die Injektion der siRNA wurde an den Tagen 0 und 3 nach Erreichen des Tumorstartvolumens (200mm^3 (+/- 10%)) vorgenommen. Nach der Injektion der siRNAs wurden die Tiere an den Tagen 6 und 7 mit jeweils 1,5 Gy bestrahlt (Abbildung 22).

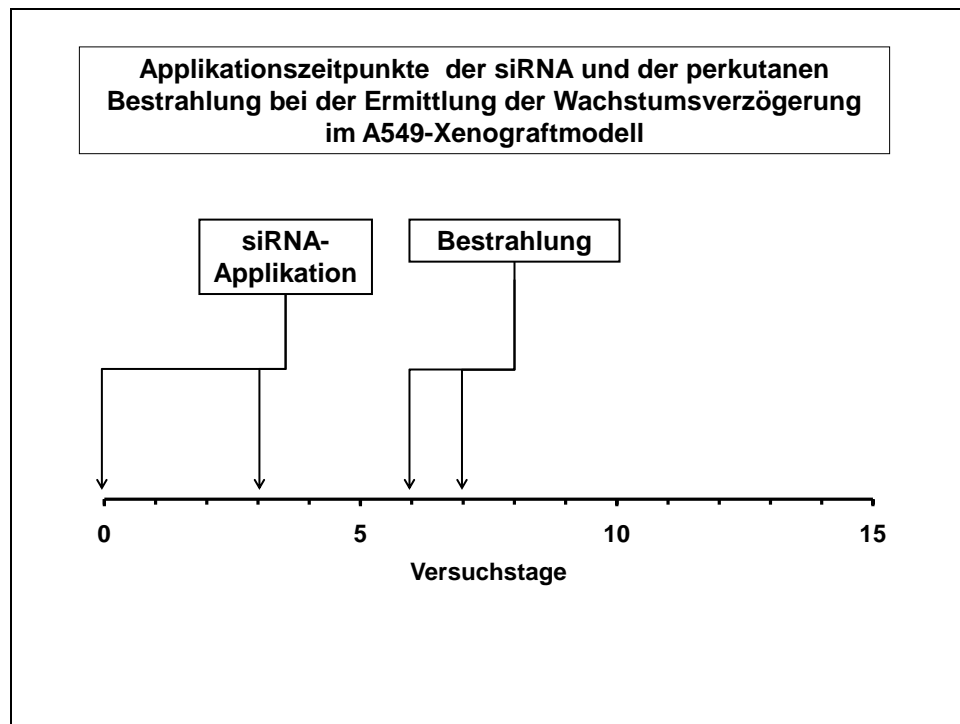


Abbildung 22: Zeitpunkte der siRNA-Injektion und der Bestrahlungen

Nach Erreichen des Tumorstartvolumens wurden die Tiere nach Injektion der spezifischen siRNAs gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha an den Tagen 0 und 3 an den Tagen 6 und 7 bestrahlt. Die Kontrollgruppe wurde nach Erreichen des Tumorstartvolumens nicht therapiert. Nach Erreichen des Tumorendvolumens von 400 mm³ wurde der Versuch beendet.

Die deutlichste Verzögerung des Tumorwachstums war in der Gruppe der Tumoren zu sehen, die die spezifische siRNA gegen HIF-1alpha in Kombination mit der Bestrahlung erhielten. In dieser Gruppe erreichten die Tumoren im Mittel erst nach 39 Tagen das Tumorendvolumen des Versuchs.

Eine schwächere Verzögerung des Tumorwachstums trat in der Gruppe der Tiere auf, die eine spezifische siRNA gegen HIF-2alpha sowie eine Bestrahlung erhielten. Hier erreichten die Tumoren im Mittel nach 24 Tagen das vorgegebene Tumorendvolumen.

Die Gruppen der Tiere, die mit siRNA-Random behandelt wurden bzw. keine Therapie erhielten (Kontrolle), zeigten ein vergleichbares Wachstumsverhalten (Abbildung 23). Die Tumoren der Gruppe der mit siRNA-Random behandelten Tiere erreichten im Mittel nach 16 Tagen das Tumorendvolumen; die Tumoren der Kontrollgruppe im Mittel nach 15 Tagen.

Die Gruppe der Tiere, die mit siRNA-Random in Kombination mit Bestrahlung behandelt wurden, erreichten im Mittel nach 20 Tagen das Endvolumen.

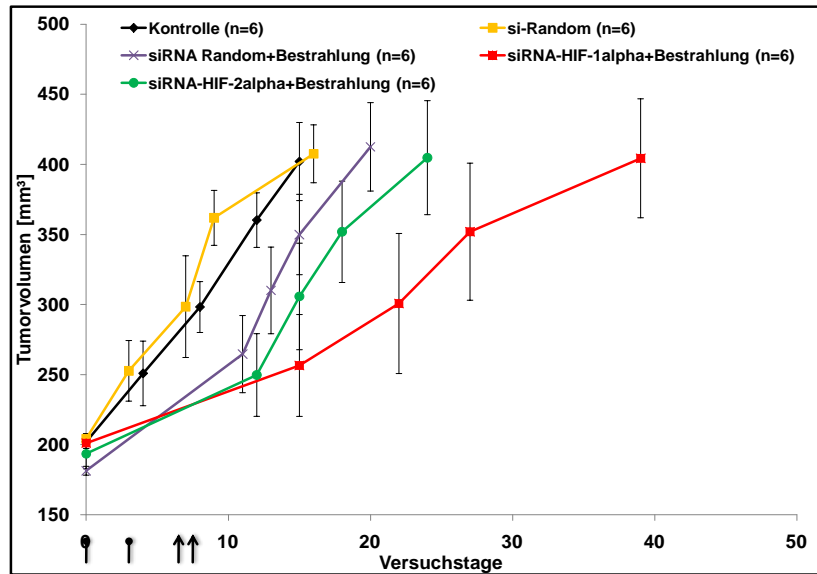


Abbildung 23: Wachstumsverhalten von A549-Tumoren nach siRNA-Injektion gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha mit nachfolgender Bestrahlung

Wachstumskurven der Kontrollgruppe (schwarz, n=6) und der mit siRNA behandelten Versuchsgruppen: siRNA-Random (orange, n=6), siRNA-Random + Bestrahlung (lila, n=6), siRNA HIF-1alpha + Bestrahlung (rot, n=6) oder siRNA HIF-2alpha + Bestrahlung (grün, n=6). Die Injektion der jeweiligen siRNA (—●) wurde nach dem Erreichen des Tumorstartvolumens und die Bestrahlung (—>) an den Tagen 6 und 7 durchgeführt. Nachfolgend verblieben die Tumoren unbehandelt und der Versuch wurde nach dem Erreichen des Tumorendvolumens beendet.

Die Wachstumsverzögerung (Abbildung 24) war nach Behandlung mit siRNA gegen HIF-1alpha und zusätzlicher Bestrahlung mit 15,95 Tagen ($p=0,02$) signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Die Kombination aus spezifischer siRNA gegen HIF-2alpha mit Bestrahlung zeigte keine signifikante Wachstumsverzögerung ($p=0,11$) gegenüber der Kontrollgruppe. Die absolute Wachstumsverzögerung betrug hier 8,9 Tage.

Die Gruppen, die mit siRNA-Random oder mit siRNA-Random in Kombination mit einer Bestrahlung behandelt wurden, zeigten ebenfalls keine signifikante Wachstumsverzögerung.

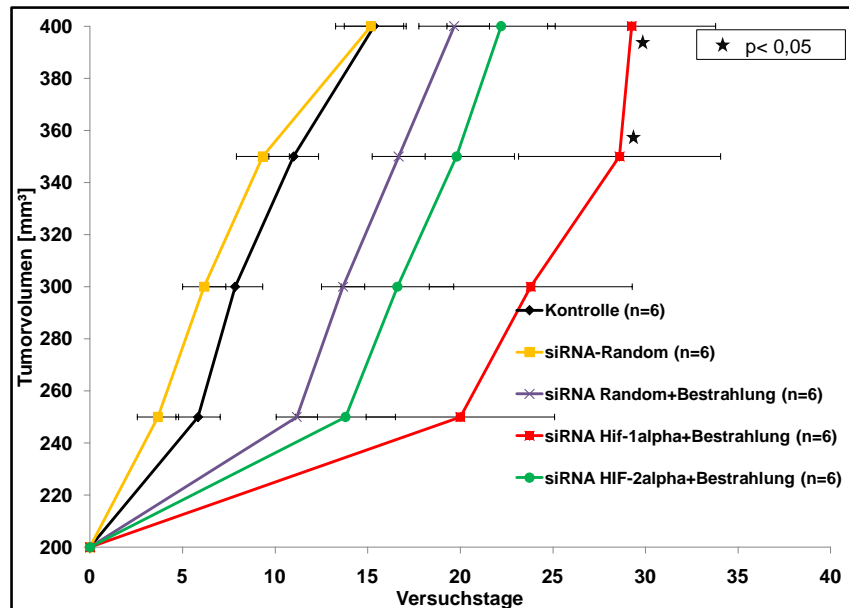


Abbildung 24: Wachstumsverzögerung von A549-Tumoren nach siRNA-Injektion gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha mit nachfolgender Bestrahlung

Wachstumsverzögerung der Kontrollgruppe (schwarz, n=6) und der mit siRNA behandelten Tumoren: siRNA-Random (orange, n=6), siRNA-Random + Bestrahlung (lila, n=6), siRNA HIF-1alpha + Bestrahlung (rot, n=6) und siRNA HIF-2alpha + Bestrahlung (grün, n=6). Bei Erreichen des Tumorendvolumens war das Tumorwachstum in der Tiergruppe, die mit siRNA gegen HIF-1alpha behandelt wurde, in Bezug auf die Kontrollgruppe signifikant reduziert ($p=0,02$).

Bei der Berechnung der normalisierten Wachstumsverzögerung bzw. des „enhancement factor“ wurde dieses ebenso deutlich (Tabelle 10). Die Kombination von siRNA gegen HIF-1alpha mit perkutaner Bestrahlung führte zu einer erheblichen Wachstumsverzögerung (normalisierte Wachstumsverzögerung: 7,25 Tage, enhancement factor: 1,12). Die Kombination von siRNA gegen HIF-2alpha mit perkutaner Bestrahlung führte zu einem schwachen wachstumsverzögernden Effekt (normalisierte Wachstumsverzögerung: 2,6 Tage, enhancement factor: 0,4).

Tabelle 10: Wachstumsverzögerung nach Injektion von spezifischer siRNA gegen HIF-1alpha oder HIF-2alpha in Kombination mit perkutaner Bestrahlung

Es werden die absolute, die normalisierte Wachstumsverzögerung und der Verstärkungsfaktor einer Kombinationstherapie aus spezifischer siRNA und Bestrahlung gezeigt. Darstellung der Kontrollgruppe (schwarz, n=6) und mit siRNA behandelten Tumoren: siRNA-Random (orange, n=6, n.s.), siRNA-Random + Bestrahlung (lila, n=6, n.s.), siRNA HIF-1alpha + Bestrahlung (rot, n=6, p=0,02) und siRNA HIF-2alpha + Bestrahlung (grün, n=6, p=0,11).

	Tage bis Endpunkts [d]	Absolute Wachstumsverzögerung [d]	Normalisierte Wachstumsverzögerung [d]	Verstärkungsfaktor	Signifikanz
Kontrolle	15,33 (+/- 1,61)				
siRNA-Random	14 (+/- 4,06)	-1,33			(n.s.)
siRNA-Random + Bestrahlung	19,67 (+/- 1,98)	6,37			(n.s.)
siRNA-HIF1a + Bestrahlung	29,25 (+/- 4,54)	15,95	7,25	1,12	(p=0,02)
siRNA-HIF2a + Bestrahlung	22,2 (+/- 2,92)	8,9	2,6	0,4	(n.s.)

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war, eine HIF-1alpha induzierte Strahlenresistenzhöhung bei humanen alveolärepiethelialen Adenokarzinomzellen (A549) im Xenograftmodell zu prüfen. Hierzu wurde ein murines Xenograftmodell bezüglich Hypoxie und Bestrahlung getestet. Als primärer Endpunkt der Untersuchung bezüglich der HIF-1alpha induzierten Strahlenresistenzhöhung wurde die Wachstumsverzögerung der Tumoren gemessen. Weitere Endpunkte der Untersuchung waren histologische Darstellung von Angiogenese, Proliferation und Apoptose sowie die Ermittlung der Perfusionsverhältnisse mittels MRT-Bildgebung.

4.1. Prüfung des Bestrahlungseffektes auf A549-Tumoren im Xenograftmodell

4.1.1. Zellapplikation und Bestrahlungsparameter

15 - 25 Tage nach **Applikation** von 5 Mio. Zellen und dem erwarteten exponentiellen Tumorumenanstieg wurde das Tumorstartvolumen von 200 mm³ erreicht. Hiernach konnte die Therapie mit perkutaner Bestrahlung bzw. Injektion von spezifischer siRNA begonnen werden. Mit der gewählten Anzahl von Zellen wurde in anderen Studien bereits gearbeitet, wobei hier vergleichbare Werte bezüglich des Tumorumens erreicht wurden [94] [73].

Die Injektion der Tumorzellen in die Flanke hatte den Vorteil sowohl der direkten Sichtbarkeit und somit Beurteilbarkeit der Tumoren als auch der optimalen Lagerung der Tiere zur Bestrahlung. Eine Injektion in z. B. die Muskulatur hätte wahrscheinlich den Vorteil, dass die Tumoren durch die bessere Blutgefäßversorgung ein deutlich schnelleres Wachstum aufgewiesen hätten. Jedoch wäre der Sauerstoffgehalt im Tumor durch die bessere Blutgefäßversorgung erhöht und somit die Konzentration von Hypoxie-induzierbaren Faktoren durch die sofortige Degradierung möglicherweise erniedrigt gewesen [16].

Zur Prüfung des Effekts ionisierender Strahlung im A549-Xenograftmodell wurden zunächst die **Bestrahlungsparameter** (Lagerung der Tiere, Photonenenergie, Feldgröße) getestet. In allen Experimenten wurde Photonenstrahlung im Megavolt-Bereich gewählt, damit eine Vergleichbarkeit mit der am Patienten verwendeten Bestrahlung hergestellt werden kann. Da das Dosismaximum bei einer Bestrahlung mit hochenergetischen Photonen in einigen cm Gewebstiefe liegt, musste durch entsprechende technische Hilfsmittel für die Mäuse eine adäquate Dosisverteilung in den subkutan liegenden Tumoren gewährleistet werden. Hierzu diente 2,0 cm dickes Plexiglas, das im Strahlengang zwischen der Bestrahlungsquelle und der Maus positioniert wurde. Durch dieses absorbierende Material erfolgte der Dosisaufbaueffekt im Plexiglas, sodass das Dosismaximum in der Tumorregion lag.

4.1.2. Dosiseffekt

Zur Untersuchung des Strahleneffektes wurden bei dem A549-Xenograftmodell zunächst Untersuchungsreihen mit unterschiedlichen Gesamtdosen durchgeführt. In Anlehnung an publizierte Daten wurde zunächst ein Dosisbereich von 1,5 - 2,0 Gy gewählt. Bromley *et al.* (2009) fanden bei einer Dosis von 1 x 2,0 Gy eine Überlebensfraktion der A549-Zellen von 0,5 [12], in einer Arbeit von Toulany *et al.* (2005) ist eine Überlebensfraktion für A549-Zellen nach Bestrahlung mit 2 x 2,0 Gy von ca. 0,4 beschrieben [83].

Bei einer einmaligen Bestrahlung mit 2,0 Gy wurde in meinen Versuchen nur eine relative Volumenreduktion von 3% erreicht und damit keine signifikante Reduktion des Tumorumfanges im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt. Diese Dosis wurde damit für die weiteren Experimente als zu gering bewertet. Eine Bestrahlung mit 6 x 1,8 Gy hatte, wie zu erwarten, einen deutlicheren Effekt auf das Tumorumfang und das Wachstumsverhalten: die Bestrahlung mit 6 x 1,8 Gy führte schon nach der zweiten Fraktion zu einer stetigen Volumenreduktion des Tumors mit einer relativen Volumenreduktion von 53% nach 6 Fraktionen ohne erneute Volumenzunahme im Verlauf des Versuchs (Abbildung 6 und Abbildung 7).

Dieser Effekt wurde für die weiteren Versuche als zu ausgeprägt bewertet, da für die Kombinationstherapie einer siRNA-Injektion und Bestrahlung eine

Inhibition des Tumorwachstums erwartet wurde, die stärker war, als die Volumenreduktion nach alleiniger Bestrahlung. Eine Messbarkeit des Tumorwachstums wäre somit wahrscheinlich nicht mehr in einem angemessenen zeitlichen Rahmen möglich gewesen.

Bei einmaliger und fraktionierter Bestrahlung konnte gezeigt werden, dass die gewählten Bestrahlungsparameter den gewünschten Effekt der Volumenreduktion zeigten und von den Tieren gut toleriert wurden. Da die Volumenreduktion bei der Bestrahlung mit 1 x 2,0 Gy nicht signifikant war, wurde für die weiterführenden Versuche eine fraktionierte Bestrahlung mit einer höheren Gesamtdosis gewählt. Darüber hinaus treten Effekte, die eine Reparatur, Repopulierung, Redistribution und vor allem Reoxygenierung in den bestrahlten Tumoren bewirken, verstärkt bei einer fraktionierten Bestrahlung auf [36]. Die Reoxygenierung fördert in einem hohen Maß die Induktion von HIF [59].

Die beobachteten Effekte der fraktionierten Bestrahlung entsprachen den Effekten, die in der Literatur bei Bestrahlung in einem ähnlichen Dosisbereich unter Verwendung des Tumormodells und bei ähnlichen Endpunkten beschrieben wurden [15]. Chinnaiyan *et al.* konnten nach Bestrahlung von A549-Tumoren mit 6 x 2,0 Gy eine Volumenreduktion von 45 % nachweisen. Noch höhere Dosisbereiche von 10 - 30 Gy wurden in Arbeitsgruppen von Rodemann *et al.* und Rose *et al.* verwendet [84] [24]. Hier wurden jedoch Kurzzeiteffekte untersucht, die nicht das Tumorwachstum bzw. die Tumorstillstandverzögerung und das damit verbundene erneute einsetzende Wachstum als Zielkriterium hatten.

Die strahlenbiologischen Effekte auf die A549-Tumoren nach einmaliger bzw. fraktionierter Bestrahlung waren auch mittels immunhistochemischer Marker nachzuweisen. Hier wurden eine signifikante Abnahme der Proliferation (Abbildung 16), sowie eine signifikante Suppression der Angiogenese (Abbildung 14) erreicht. Die reduzierte Proliferationsrate kann auf eine strahleninduzierte Inhibition des Zellzyklus zurückgeführt werden, da der

Übergang der Zellen in die verschiedenen Zellzyklusphasen durch ionisierende Strahlung inhibiert wird [54] [81] [56].

Eine signifikante Beeinflussung der Apoptoserate der bestrahlten Tumoren konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 12). Dieses ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die A549-Zellen nach ionisierender Bestrahlung besonders apoptoseresistent sind. He *et al.* zeigten 2007 an A549-Zellen, dass diese eine Resistenz gegenüber strahleninduzierter Apoptose haben. Darüber hinaus konnten sie nachweisen, dass nach Hemmung der Bcl-2 Bindungsproteine mit spezifischer shRNA diese Resistenz überwunden werden kann [34]. Diese Resistenz wurde auch von Guo *et al.* dargestellt, die ebenfalls eine Steigerung der Bcl-2 Expression nach Bestrahlung nachwiesen [32]. Die immunhistochemischen Ergebnisse in meiner Arbeit entsprechen publizierten Daten.

4.1.3. Untersuchung der Tumorperfusion durch MRT

Durch MRT-Untersuchungen konnten die Perfusionsverhältnisse in den Versuchstieren charakterisiert werden. Das Tumorzentrum war minderperfundiert, während die Tumorperipherie gut durchblutet war. Es ist bekannt, dass in minderperfundierten Tumorarealen durch die vorherrschende Hypoxie HIF induziert wird [23]. In unserer Arbeitsgruppe wurden zeitgleich Versuche mit MRT-Perfusionsmessungen in Kombination mit immunhistochemischen Färbungen mit Pimonidazol im beschriebenen Xenograftmodell durchgeführt. Fokas *et al.* konnten im gleichen Tiermodell eine Anreicherung von Pimonidazol in minderperfundierten Bereichen der Tumoren nachweisen [24]. Janssen *et al.* (2002) zeigten eine direkte Korrelation zwischen einer Expression von HIF-1alpha und der Anreicherung von Pimonidazol im Tumorgewebe [42]. Vor diesem Hintergrund kann von einer erhöhten Expression von HIF in den minderperfundierten Tumorarealen ausgegangen werden.

Zusammenfassend stellt sich das murine Tumormodell für weiterführende Versuche mit spezifischer Inhibition von HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha als geeignet dar. Neben dem Nachweis minderperfundierter und somit hypoxischer

Tumorareale konnte eine signifikante Tumolvolumenreduktion nach fraktionierter Bestrahlung erreicht werden. Darüber hinaus konnte mittels immunhistochemischer Untersuchungen die Wirkung einer Bestrahlung auf die Tumoren näher charakterisiert werden.

4.2. Prüfung des Bestrahlungseffekts nach Inhibition von HIF mittels siRNA auf A549-Tumoren im Xenograftmodell

4.2.1. Wachstumsverzögerung

Als primärer Endpunkt der Untersuchung einer HIF vermittelten Strahlenresistenz wurden Wachstumsverzögerungen der Tumore gemessen. Die Verwendung des Growth-Delay-Versuchsaufbaus wird in der Literatur als vorteilhaft bezüglich einer Testung einer veränderten Strahlensensibilität beschrieben [17] [36]. Grundlage der Tumorstadiumsverzögerung ist, dass Tumoren, die auf eine bestimmte Therapie reagieren, jedoch durch diese nicht vollkommen abgetötet werden, sich regenerieren und wieder zu wachsen beginnen. Als Tumorstadiumsverzögerung wird die Zeit angesehen, die ein behandelter Tumor im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle benötigt, um ein spezifisches Tumorstadium zu erreichen.

Da die Versuchstiere nach Bestrahlung eine längere Zeit überleben sollten, war die gute Toleranz der Bestrahlung für die Tiere grundlegende Voraussetzung für die nachfolgenden Inhibitionsversuche bzw. Growth-Delay-Versuche mittels spezifischer siRNA gegen HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha in Kombination mit perkutaner Bestrahlung.

Die Zeitpunkte für die Injektion der siRNA gegen HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha ohne weitere Therapie sowie die Zeitpunkte für die Injektion der spezifischen siRNAs gegen HIF-1alpha und HIF-2alpha in Kombination mit perkutaner Bestrahlung wurden in Anlehnung an die Literatur gewählt [44] [43] [2]. Hier wurde mittels Real Time PCR gezeigt, dass die zweimalige Injektion der

spezifischen siRNA gegen HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha in gleichem Zeitschema zu einer signifikanten Reduktion der Ziel-mRNAs führt. Der Effekt konnte bis zu 96 h nach Injektion der spezifischen siRNA nachvollzogen werden [43]. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die intraperitoneale Injektion der spezifischen siRNAs, die zweimal wöchentlich über insgesamt fünf Wochen durchgeführt wurde, zu einer signifikanten Wachstumshemmung von subkutanen A549-Tumoren führte. Der hemmende Einfluss wurde durch Kontrolle der spezifischen mRNAs für HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha über Real Time PCR bestätigt [43]. Daher stellte sich das gewählte Applikationsschema (Abbildung 22) als geeignet dar.

Die Wahl des Versuchsaufbaus in Bezug auf die Wachstumsverzögerung war für weiterführende Auswertungsmöglichkeiten der implantierten Tumoren allerdings nachteilig:

In der Zeit bis zum Erreichen des Tumorendvolumens verblieben die Tiere unbehandelt. Für die Gruppe der Tiere, die mit siRNA gegen HIF-1alpha in Kombination mit perkutaner Bestrahlung behandelt wurden, betrug die Zeit bis zum Erreichen des Tumorendvolumens im Mittel 29,25 (+/- 4,54) Tage. Die Aufarbeitung der Tumoren mittels immunhistochemischer Untersuchung wäre zwar möglich gewesen, aber die hierdurch ermittelten Daten ließen sich nach Ablauf von fast einem Monat nur schwer mit einer vorhergehenden Therapie in Bezug setzen. Daher können mit diesem Versuchsaufbau keine Kurzzeiteffekte auf das Expressionsverhalten der Zielgene von HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha nach alleiniger Strahlentherapie bzw. nach Injektion von siRNA gegen HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha in Kombination mit nachfolgender Bestrahlung untersucht werden.

Weiterführende Untersuchungen von Kurzzeiteffekten auf das Expressionsverhalten der Zielgene von HIF-1 bzw. HIF-2 nach alleiniger Strahlentherapie bzw. nach Injektion von siRNA gegen HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha in Kombination mit nachfolgender Bestrahlung wurden in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Sie sind jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

4.2.2. Suppression von HIF-1alpha reduziert die Strahlenresistenz im A549-Xenograftmodell

Aus strahlenbiologischer Sicht haben die in der MRT-Perfusion dargestellten minderperfundierten Tumoreale zentralen Einfluss auf die Strahlensensibilität. Die Sauerstoffkonzentration in bestrahlten Geweben erhöht über Radikalbildung die Strahlenwirkung auf Gewebe um den Faktor 3. Dieser Sauerstoffverstärkungsfaktor kommt nicht zum Tragen, wenn große Tumoreale, die bestrahlt werden, hypoxisch sind. Zusätzlich kann es durch die Hypoxie zur Induktion von HIF kommen, die die Resistenz gegen ionisierende Strahlung weiter fördern kann. Daher habe ich den Einfluss der Hypoxie-induzierbaren Faktoren auf das Tumorstadiumsverhalten im A549-Xenograftmodell in Bezug auf die Strahlenresistenz untersucht.

Gezielt wurde die Bestrahlungsdosis so gewählt, dass der Effekt der Bestrahlung nach Modulation der Hypoxie-induzierbaren Faktoren durch die Anwendung von spezifischer siRNA in Bezug auf Strahlensensibilität gemessen werden konnte. Die perkutane Bestrahlung mit 6 MeV-Photonen und einer Dosis von $2 \times 1,8$ Gy zeigte einen optimalen Effekt bezüglich einer Wachstumsverzögerung (siehe 3.3.1).

Als Kontrolle wurden Versuche vorgenommen, die zum Ausschluss der Beeinflussung des Tumorstadiumsverhaltens durch die Injektion einer siRNA dienten. Hierzu wurde den Tieren in der Kontrollgruppe eine nicht spezifische siRNA-Random appliziert, die auf die Zellen der Maus keinen Einfluss hat. Wie erwartet hatte die Injektion von siRNA-Random keinen Einfluss auf das Wachstum der Tumoren (siehe 3.3.2).

Zusätzlich wurde in dem Versuch siRNA gegen HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha ohne eine nachfolgende Bestrahlung appliziert. Nach alleiniger Injektion der spezifischen siRNA konnte wie erwartet [43] eine signifikante Wachstumsverzögerung der Tumoren nachgewiesen werden. Die Wachstumsverzögerung war mit 8,7 Tagen im Mittel nach Injektion von siRNA gegen HIF-1alpha vergleichbar stark ausgeprägt wie nach der Injektion von siRNA gegen HIF-2alpha (6,3 Tage, siehe 3.3.2).

Zur Untersuchung des Einflusses von HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha auf die Bestrahlungseffekte wurde im Weiteren die Wachstumsverzögerung der Tumore nach Inhibition der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha und fraktionierter Bestrahlung gemessen (siehe 3.3.3).

Für die Prüfung der Wachstumsverzögerung nach spezifischer Inhibition von HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha in Kombination mit Bestrahlung wurde die Einzeldosis auf 1,5 reduziert, da davon auszugehen war, dass eine spezifische Inhibition von HIF-1alpha die Strahlensensibilität der Tumorzellen erhöht. Dieser Effekt wurde von Moeller *et al.* beschrieben [59]. In seiner Arbeit wurde gezeigt, dass fraktionierte Bestrahlung eine Induktion von HIF1 auf Zielgenebene auslösen kann, die vermutlich durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bedingt ist. Es war also zu erwarten, dass die von Toulany *et al.* angegebene Überlebensfraktion von 0,4 [83] durch Inhibition von HIF weiter reduziert würde.

In unseren Versuchen bewirkte die Inhibition von HIF-1alpha mit nachfolgender Bestrahlung der Tumoren eine signifikant stärkere Wachstumsverzögerung der Tumoren als die selektive Inhibition von HIF-2alpha mit nachfolgender Bestrahlung. Nach kombinierter Behandlung betrug die absolute Wachstumsverzögerung im Mittel 15,95 Tage für HIF-1alpha im Vergleich zu 8,90 Tagen im Mittel für HIF-2alpha. Der rechnerisch ermittelte Verstärkungsfaktor betrug 1,12 für HIF-1alpha in Bezug auf die Bestrahlungskontrollgruppe. Für HIF-2alpha betrug dieser Wert nur 0,4 (Tabelle 10). Ein wichtiges Ergebnis der Versuche ist, dass es nach Injektion von spezifischer siRNA gegen HIF-1alpha in Kombination mit ionisierender Bestrahlung zu einer Zunahme der Wachstumsverzögerung von absolut 15,95 Tagen kam.

Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese der Arbeit. Die Hypothese, dass hypoxische Tumoreale gegenüber Bestrahlung resistent sind, wurde erstmals 1953 von Gray formuliert [26]. Dass Hypoxie sogar ein Stimulus für Tumorprogression und Angiogenese ist, wurde später erkannt [45] [51] [60] [13]. Die klinische Bedeutung von Hypoxie für das Tumorwachstum belegen

verschiedene Studien, die zeigten, dass Hypoxie ein Resistenzfaktor für die strahlentherapeutische Behandlung von Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, des Uterus und von Sarkomen ist [25] [10] [9] [11]. Birner und Brizel [10] [9] [11] beschrieben, dass ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck während der Bestrahlungsserie von Tumoren der Kopf-Hals-Region mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Residualtumor bei Abschluss der Bestrahlung assoziiert ist. Fyles konnte 1998 darstellen, dass die Tumorgöße und damit verbunden der Anteil an hypoxischen Arealen einen signifikanten Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben, die Rezidivwahrscheinlichkeit und das Gesamtüberleben von Patientinnen mit Zervixkarzinomen haben [25]. Hung *et al.* (2009) ermittelten bei Patienten mit NSCLC bei einer Überexpression von HIF-1alpha ein signifikant schlechteres Gesamt- und progressionsfreies Überleben [39] und wiesen damit die klinische Bedeutung einer Überexpression von HIF-1alpha nach. In weiteren Arbeiten konnte als verantwortlicher Transkriptionsfaktor für eine Hypoxie-vermittelte Aggressivität von Tumoren der Hypoxie-induzierbare Faktor HIF-1alpha identifiziert werden [21]. Diese Aggressivität drückt sich durch eine Beeinflussung von Metabolismus, Apoptose und Angiogenese aus.

HIF-1alpha spielt in der Hypoxie-vermittelten **Apoptose** durch Regulation spezifischer Gene eine wichtige Rolle, weil es die Expression von Bcl-2 Bindungsproteinen, BNIP3 und NIX erhöht. Die Inhibition der Apoptose über Bcl-2 wird gemindert [65], indem es zu einer Erhöhung der proapoptotischen Proteine (Bax, Bad, Bak und Bid) kommt [49] [60] [30]. Außerdem führt die HIF-1alpha induzierte Stabilisierung des p53 zu einer Erhöhung der Expression von proapoptotischen Proteinen [30].

Es ist bekannt, dass HIF-1alpha ebenfalls einen direkten Einfluss auf die **Angiogenese** hat. Moeller *et al.* zeigten in immunhistochemischen Färbungen von Tumoren, dass eine Überexpression von HIF-1alpha und in Korrelation dazu eine gesteigerte Angiogenese in hypoxischen Tumorearealen bestehen [60]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass HIF-1alpha einen direkten Einfluss auf proangiogenetische Faktoren hat. HIF-1alpha greift direkt in die Expression

von z. B. VEGF ein und unterstützt somit die Angiogeneese in hypoxischen Arealen [51].

Neben der Steigerung der Angiogenese durch HIF wird in Verbindung mit Bestrahlung ein weiterer wichtiger Effekt beschrieben. Moeller *et al.* zeigten, dass die strahleninduzierte Reoxygenierung der Tumoren zu einem Anstieg der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt [60].

In Bezug auf den **Metabolismus** induziert HIF-1alpha insbesondere Gene, die die anaerobe Glykolyse begünstigen und die mitochondriale Atmung inhibieren (Hexokinase 1, Hexokinase 2, Enolase 1, Glucose-Transporter 1, Pyruvat-Kinase M, u.a.). Dieser Mechanismus spielt bei der Tumorprogression eine bedeutsame Rolle, da er der Sicherung des Energiebedarfes und der Entstehung von Metastasen dient [78] [93]. Darüber hinaus wird durch die Induktion der anaeroben Glykolyse vermehrt Laktat gebildet [93], das als Radikalfänger fungiert und damit die Wirkung von Bestrahlung abschwächt [31] [53].

Zusammenfassend führen eine Überexpression von HIF-1alpha sowie dessen Induktion durch Reoxygenierung nach Bestrahlung zu Steigerung der Zellselektion, Förderung der Angiogenese und Vermittlung von Strahlenresistenz. Mittels spezifischer Inhibition von HIF-1alpha konnte eine Verminderung der Strahlenresistenz von A549-Tumoren im Xenograftmodell erzielt werden. Dieses kann mit der Hemmung der strahlenunabhängigen Induktionswege von HIF-1alpha aufgrund von chronischer Hypoxie in zentralen Tumorarealen als auch mit bestrahlungsabhängigen Induktionswegen über Sauerstoffradikale (ROS) und Reoxygenierungseffekten in Zusammenhang stehen.

Die über spezifische Inhibition des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1alpha erhobenen Daten zur Beeinflussung der Strahlenresistenz der Tumoren in dem verwendeten A549-Xenograftmodell stimmen mit dem aktuellen Stand der Literatur überein. Daraus ergibt sich, dass die gewählten Behandlungsparameter des A549-Xenograftmodells geeignet sind für weiterführende Untersuchungen zur Beeinflussung der HIF-1alpha vermittelten

Strahlenresistenz. Eine genaue Charakterisierung der Genexpression (z. B. für VEGF, GLUT-1) nach alleiniger Bestrahlung und in Kombination mit einer spezifischen Inhibition von HIF-1alpha und HIF-2alpha muss in weiteren Untersuchungen getestet werden. Als weiterführendes Untersuchungsziel kann die Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren für die Strahlensensibilität des Bronchialkarzinoms gegenüber Partikelbestrahlung im Vergleich zur Photonenbestrahlung ebenfalls mit dem Tiermodell untersucht werden.

4.2.3. HIF-2alpha ohne Einfluss auf die Strahlenresistenz

In der vorgelegten Arbeit konnte durch spezifische Inhibition von HIF-2alpha ein signifikanter Effekt auf das Tumorwachstum im A549-Xenograftmodell gezeigt werden. Im Gegensatz dazu fehlte jedoch ein signifikanter Einfluss bezüglich der Strahlensensibilität der untersuchten Tumoren.

Diese signifikanten Unterschiede zwischen HIF-1alpha als strahlenresistenzverstärkender Faktor sowie HIF-2alpha als nicht-strahlenresistenzverstärkender Faktor könnten in differenter Aktivierung an Zielgenen liegen.

Für Lungentumoren konnte eine gemeinsame Überexpression von HIF-1alpha und HIF-2alpha gezeigt werden, wobei die simultane HIF-2alpha Expression zu einer schlechteren Prognose führt [28].

Zahlreiche Gene werden durch die Transkriptionsfaktoren HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha unterschiedlich stark exprimiert. Beispielsweise zeigen Tumoren, die eine erhöhte Expression von HIF-2alpha aufweisen, auch eine besonders hohe Expression von VEGF und dessen Rezeptor (VEGFR2). Dieses ist ursächlich mit Angiogenese verbunden, v.a. mit der Dichte kleiner Gefäße. Im Gegensatz dazu ist die Expression von VEGF in Tumoren, die eine hohe Konzentration von HIF-1alpha aufwiesen, deutlich schwächer [45] [28].

HIF-1alpha greift im Weiteren direkt in den Energiestoffwechsel ein und bewirkt eine Verschiebung der Glykolyse zur aeroben Energiegewinnung. Eine Erhöhung des Laktats in Zellen führt zu einer Reduktion der Strahlensensibilität [31].

Im Gegensatz dazu scheint HIF-2alpha weniger in Bereiche der Zellphysiologie, die zu einer Strahlenresistenz führen, einzugreifen.

Neben einem unterschiedlichen Effekt von HIF-1alpha und HIF-2alpha auf die Expression von Zielgenen werden die Faktoren unterschiedlich stark nach Bestrahlung exprimiert. Während HIF-1alpha direkt über die strahleninduzierte Reoxygenierung induziert wird, wird HIF-2alpha nicht durch eine Bestrahlung induziert [59].

In dem verwendeten A549-Xenograftmodell konnten minderperfundierte und somit hypoxische Tumorareale nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte der Effekt einer perkutanen Bestrahlung der A549-Tumoren sowohl makroskopisch als auch immunhistochemisch quantifiziert werden. In weiteren Versuchen wurde dargestellt, dass nach spezifischer Ausschaltung von HIF-1alpha mit siRNA die Strahlenresistenz der A549-Tumoren im Vergleich zu Kontrollgruppe signifikant sinkt (Abbildung 24). Das heißt, dass mit dem gewählten Xenograftmodell über eine Inhibition von HIF-1alpha eine Beeinflussung der Strahlenresistenz nachvollzogen werden kann.

Eine genaue Spezifizierung des Effekts von HIF-1alpha in Kombination mit Bestrahlung auf Zielgenebene (z. B. VEGF, GLUT-1) wird mit den dargestellten Untersuchungen im beschriebenen Xenograftmodell nicht erreicht. Diese Effekte wurden in weiterführenden Versuchen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Letztlich hat HIF-1alpha einen komplexen Einfluss auf die Tumorzellbiologie. Diese Wirkung spielt in der Optimierung von Strategien für eine HIF-1alpha-Hemmung vor allem in Kombination mit ionisierender Strahlung eine wichtige Rolle.

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war, eine HIF-1alpha induzierte Strahlenresistenzhöhung bei humanen alveolarepithelialen Adenokarzinomzellen (A549) im murinen Xenograftmodell zu prüfen. In dem gewählten Tumormodell wurden humane Adenokarzinomzellen (A549) verwendet, die subkutan implantiert wurden. Als Versuchstiere wurden wegen der bestehenden Toleranz gegen Allo- und Xenotransplantate Mäuse des Stammes CD1 nu/nu gewählt.

In dem ersten Teil der Arbeit wurden Bestrahlungsparameter an den subkutanen Tumoren getestet. Es zeigte sich nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 6 x 1,8 Gy eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens um 53%. Eine einmalige Bestrahlung mit 2,0 Gy führte zu keiner signifikanten Beeinflussung des Tumolvolumens.

Bei der weiterführenden immunhistochemischen Darstellung des Verhaltens der Tumoren auf eine Bestrahlung wurde nachgewiesen, dass es zu einer signifikanten Reduktion der Angiogenese sowie der Proliferation kam. Einen signifikanten Effekt in Bezug auf die Apoptoserate konnte nicht nachgewiesen werden.

Für die Darstellung der Perfusionsverhältnisse in den subkutan liegenden Tumoren wurden mittels Magnetresonanztomographie Perfusionsaufnahmen angefertigt. Hier zeigte sich eine deutliche Minderperfusion des Tumorzentrums bei guter Perfusion der Tumorrandgebiete. Diese Minderperfusion wies auf hypoxische Verhältnisse im Tumorzentrum hin, die auf eine Expression von HIF hinweisen.

Die Beeinflussbarkeit dieser Hypoxie-induzierten Strahlenresistenz wurde in einem zweiten Versuchsabschnitt mit dem gewählten A549-Xenograftmodell unter Verwendung von spezifischer siRNA gegen die unter Hypoxie vermehrt exprimierten Faktoren HIF-1alpha und HIF-2alpha untersucht. Hierzu wurde die induzierte Wachstumsverzögerung nach spezifischer Inhibition der Faktoren

HIF-1alpha bzw. HIF-2alpha und nach spezifischer Inhibition dieser Faktoren in Kombination mit percutanen Photonenbestrahlung gemessen.

Die alleinige Inhibition mit spezifischer siRNA gegen die Faktoren HIF-1alpha und HIF-2alpha hatte signifikante wachstumsverzögernde Effekte auf die subkutanen Tumoren. Die Ausprägung der Wachstumsverzögerung bei Inhibition dieser beiden Faktoren war vergleichbar stark ausgeprägt (absolute Wachstumsverzögerung: HIF-1alpha 8,7 Tage, HIF-2alpha 6,3 Tage).

Unterschiedliche wachstumsverzögernde Effekte bestanden bei Inhibition mit spezifischer siRNA gegen die Faktoren HIF-1alpha, bzw. HIF-2alpha, beide kombiniert mit anschließender Photonenbestrahlung. Der wachstumsverzögernde Effekt nach Inhibition von HIF-1alpha mit nachfolgender Bestrahlung war signifikant stärker ausgeprägt als nach Inhibition von HIF-2alpha mit nachfolgender Bestrahlung (absolute Wachstumsverzögerung: HIF-1alpha 15,95 Tage, HIF-2alpha 8,9 Tage).

Daraus ergibt sich, dass über Inhibition des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1alpha Einfluss auf die Hypoxie-vermittelte Strahlenresistenz und damit auf das Wachstum der A549-Tumoren genommen werden kann.

Zur weiterführenden Untersuchung dieses Effekts sind weiterführende Untersuchungen mit Charakterisierung der Einflüsse auf Zielgenebene notwendig.

6. Summary

This paper is concerned with the examination of a HIF-1alpha induced increase of resistance against radiation in a xenograft model with alveolar adenocarcinoma in mice by testing the effects of an inhibition of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha or HIF-2alpha.

In the chosen tumour model of a subcutaneous induced alveolar adenocarcinoma in mice, human adenocarcinoma cells (A549) were used.

In all experiments CD1 nu/nu nude mice were chosen for their existing and documented tolerance against allo- and xenografts.

In the first part of this paper the therapeutical irradiation dose was tested. It was verified that fractional irradiation with 6 x 1.8 Gy produces a significant reduction of the tumour volume. There was no significant reduction after a single irradiation with 2.0 Gy.

In further immunohistochemical investigations the behavior of the tumors to external radiation has been shown that there was a significant reduction of angiogenesis and proliferation. A significant effect in terms of apoptosis could not be detected

MRT-perfusion measurements were taken to view the state of perfusion in the subcutaneous tumours. This demonstrated a hypoperfusion of the tumour centre with a good perfusion of the tumour outlines.

This hypoperfusion suggested hypoxic conditions in the tumour centre.

The suggestibility of the hypoxia-induced radiation resistance was tested in the second part of this paper in concluding experiments with the selected A549 xenograft model. The usage of specific siRNA against the increasingly expressed factors under hypoxia factors, HIF-1alpha and HIF-2alpha were investigated.

After specific inhibition of the factors HIF-1alpha and HIF-2alpha and after specific inhibition of these factors in combination with external photon irradiation an induced growth delay was measured. It was shown that the sole inhibition with specific siRNA against the factors HIF-1alpha and HIF-2alpha significant delayed the growth of subcutaneous tumours.

It was verified that the characteristics of the growth delays after inhibition of these two factors in each case were comparably strong (absolute growth delay: HIF-1alpha 8.7 days, HIF2-alpha 6.3 days).

Moreover, it was shown, that the inhibition with specific siRNA against the factors HIF-1alpha or HIF-2alpha combined with photon irradiation exhibited subsequent differences in growth delay effects. It could be demonstrated that the delaying effects after inhibition of HIF-1alpha with subsequent radiotherapy were significantly more distinctive than after inhibition of HIF-2alpha with subsequent radiotherapy (absolute growth delay: HIF-1alpha 15.95 days, HIF-2alpha 8.9 days).

From this the conclusion can be drawn that the inhibition of hypoxia inducible factor HIF 1alpha has influence on the hypoxia-mediated radiation resistance. Tumor growth can be influenced by inhibiting of HIF-1alpha.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

- [1] Aebersold, D. M.; Burri, P.; Beer, K. T.; Laissue, J.; Djonov, V.; Greiner, R. H.; Semenza, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. In: *Cancer Res* 61 (2001) Nr. 7, S. 2911-6
- [2] Aigner, A. Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 76 (2007) Nr. 1, S. 9-21
- [3] Arendt, M.: *Faserjahre*. Sankt Augustin: 2007. - 3-88383-721-0
- [4] Baba, Y.; Noshio, K.; Shima, K.; Irahara, N.; Chan, A. T.; Meyerhardt, J. A.; Chung, D. C.; Giovannucci, E. L.; Fuchs, C. S.; Ogino, S. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. In: *Am J Pathol* 176 (2010) Nr. 5, S. 2292-301
- [5] Bartecchi, C. E.; MacKenzie, T. D.; Schrier, R. W. The human costs of tobacco use (1). In: *N Engl J Med* 330 (1994) Nr. 13, S. 907-12
- [6] Batzler, W.: *Krebs in Deutschland 2003 - 2004*. Berlin: 6., überarb. Aufl. Aufl. Robert Koch-Institut, 2008. - 9783896061829
- [7] Beadsmoore, C. J.; Screaton, N. J. Classification, staging and prognosis of lung cancer. In: *Eur J Radiol* 45 (2003) Nr. 1, S. 8-17
- [8] Becker, N. - S. D. - S. C. - Z. H. Entwicklung von Inzidenz (1970-2003) und Mortalität (1952-2003) an Krebs in Deutschland. In: *Der Onkologe* (2008) Nr. 14, S. 276-290
- [10] Birner, P.; Schindl, M.; Obermair, A.; Plank, C.; Breitenecker, G.; Oberhuber, G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. In: *Cancer Res* 60 (2000) Nr. 17, S. 4693-6
- [9] Birner, P.; Schindl, M.; Obermair, A.; Breitenecker, G.; Oberhuber, G. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. In: *Clin Cancer Res* 7 (2001) Nr. 6, S. 1661-8
- [11] Brizel, D. M.; Dodge, R. K.; Clough, R. W.; Dewhirst, M. W. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. In: *Radiother Oncol* 53 (1999) Nr. 2, S. 113-7
- [12] Bromley, R.; Oliver, L.; Davey, R.; Harvie, R.; Baldock, C. Predicting the clonogenic survival of A549 cells after modulated x-ray irradiation using the linear quadratic model. In: *Phys Med Biol* 54 (2009) S. 187-206
- [13] Carmeliet, P.; Dor, Y.; Herbert, J. M.; Fukumura, D.; Brusselmans, K.; Dewerchin, M.; Neeman, M.; Bono, F.; Abramovitch, R.; Maxwell, P.; Koch, C. J.; Ratcliffe, P.; Moons, L.; Jain, R. K.; Collen, D.; Keshert, E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. In: *Nature* 394 (1998) Nr. 6692, S. 485-90
- [14] Caro, J. Hypoxia regulation of gene transcription. In: *High Alt Med Biol* 2 (2001) Nr. 2, S. 145-54
- [15] Chinnaiyan, P.; Huang, S.; Vallabhaneni, G.; Armstrong, E.; Varambally, S.; Tomlins, S.; Chinnaiyan, A.; Harari, P. Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal

- growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). In: *Cancer Res* 65 (2005) Nr. 8, S. 3328-35
- [16] Choi, Y.; Cowan, D. B.; Nathan, M.; Poutias, D.; Stamm, C.; del Nido, P. J.; McGowan, F. X. J. Myocardial hypertrophy overrides the angiogenic response to hypoxia. In: *PLoS One* 3 (2008) Nr. 12, S. e4042
- [17] Colevas, A. D.; Brown, J. M.; Hahn, S.; Mitchell, J.; Camphausen, K.; Coleman, C. N. Development of investigational radiation modifiers. In: *J Natl Cancer Inst* 95 (2003) Nr. 9, S. 646-51
- [18] Compennolle, V.; Brusselmans, K.; Acker, T.; Hoet, P.; Tjwa, M.; Beck, H.; Plaisance, S.; Dor, Y.; Keshet, E.; Lupu, F.; Nemery, B.; Dewerchin, M.; Van Veldhoven, P.; Plate, K.; Moons, L.; Collen, D.; Carmeliet, P. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. In: *Nat Med* 8 (2002) Nr. 7, S. 702-10
- [19] Detterbeck, F. C.; Boffa, D. J.; Tanoue, L. T. The new lung cancer staging system. In: *Chest* 136 (2009) Nr. 1, S. 260-71
- [20] Dewhirst, M.; Cao, Y.; Moeller, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. In: *Nat Rev Cancer* 8 (2008) Nr. 6, S. 425-37
- [21] Dewhirst, M. Intermittent hypoxia furthers the rationale for hypoxia-inducible factor-1 targeting. In: *Cancer Res* 67 (2007) Nr. 3, S. 854-5
- [22] Favier, J.; Lapointe, S.; Maliba, R.; Sirois, M. HIF2 α reduces growth rate but promotes angiogenesis in a mouse model of neuroblastoma. In: *BMC Cancer* 7 (2007) S. 139
- [23] Fedele, A.; Whitelaw, M. L.; Peet, D. Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. In: *Mol Interv* 2 (2002) Nr. 4, S. 229-43
- [24] Fokas, E.; Hanze, J.; Kamlah, F.; Eul, B. G.; Lang, N.; Keil, B.; Heverhagen, J. T.; Engenhart-Cabillic, R.; An, H.; Rose, F. Irradiation-dependent effects on tumor perfusion and endogenous and exogenous hypoxia markers in an A549 xenograft model. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 77 (2010) Nr. 5, S. 1500-8
- [25] Fyles, A. W.; Milosevic, M.; Wong, R.; Kavanagh, M. C.; Pintilie, M.; Sun, A.; Chapman, W.; Levin, W.; Manchul, L.; Keane, T. J.; Hill, R. P. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. In: *Radiother Oncol* 48 (1998) Nr. 2, S. 149-56
- [27] Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. In: *J Natl Cancer Inst* 51 (1973) Nr. 5, S. 1417-23
- [28] Giatromanolaki, A.; Koukourakis, M. I.; Sivridis, E.; Turley, H.; Talks, K.; Pezzella, F.; Gatter, K. C.; Harris, A. L. Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. In: *Br J Cancer* 85 (2001) Nr. 6, S. 881-90
- [29] Goeckenjan, G.; Sitter, H.; Thomas, M.; Brandscheid, D.; Flentje, M.; Griesinger, F.; Niederle, N.; Stuschke, M.; Blum, T.; Deppermann, K. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up of lung cancer. In: *Pulmonologie* 64 (2010) Nr. 2, S. 1-164

- [26] GRAY, L. H.; CONGER, A. D.; EBERT, M.; HORNSEY, S.; SCOTT, O. C. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. In: *Br J Radiol* 26 (1953) Nr. 312, S. 638-48
- [30] Greijer, A. E.; van der Wall, E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. In: *J Clin Pathol* 57 (2004) Nr. 10, S. 1009-14
- [31] Groussard, C.; Morel, I.; Chevanne, M.; Monnier, M.; Cillard, J.; Delamarche, A. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. In: *J Appl Physiol* 89 (2000) Nr. 1, S. 169-75
- [32] Guo, W.; Lin, R.; Huang, J.; Zhou, Z.; Yang, J.; Guo, G.; Wang, S. Identification of differentially expressed genes contributing to radioresistance in lung cancer cells using microarray analysis. In: *Radiat Res* 164 (2005) Nr. 1, S. 27-35
- [33] Hammond, S. M.; Bernstein, E.; Beach, D.; Hannon, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. In: *Nature* 404 (2000) Nr. 6775, S. 293-6
- [34] He, D.; Zhang, Y.; Liu, G. Bcl-2 small hairpin RNAs enhance radiation-induced apoptosis in A549 cells. In: *Cell Biol Int* 31 (2007) Nr. 11, S. 1442-5
- [35] Hentschel, S.: *Das Manual der epidemiologischen Krebsregistrierung*. München [u.a.]: Zuckschwerdt, 2008. - 978-3-88603-939-5
- [36] Herrmann, T.; Baumann, M.; Dörr, W.: *Klinische Strahlenbiologie*. München [u.a.]: 4., völlig überarb. Aufl. Elsevier, Urban und Fischer, 2006. - 3437239600
- [37] Hirota, K.; Semenza, G. L. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. In: *Biochem Biophys Res Commun* 338 (2005) Nr. 1, S. 610-6
- [38] Hockel, M.; Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. In: *J Natl Cancer Inst* 93 (2001) Nr. 4, S. 266-76
- [39] Hung, J.; Yang, M.; Hsu, H.; Hsu, W.; Liu, J.; Wu, K. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 α , TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. In: *Thorax* 64 (2009) Nr. 12, S. 1082-9
- [40] International Agency for Research on Cancer (IARC): *Monographs Volume 35: Polynuclear Aromatic Compounds Part 4, Bitumens, Coal-tars and Derived Products, Shale-oils and Soots*. 1985.
- [41] Iyer, N. V.; Kotch, L. E.; Agani, F.; Leung, S. W.; Laughner, E.; Wenger, R. H.; Gassmann, M.; Gearhart, J. D.; Lawler, A. M.; Yu, A. Y.; Semenza, G. L. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . In: *Genes Dev* 12 (1998) Nr. 2, S. 149-62
- [42] Janssen, H. L. K.; Haustermans, K. M. G.; Sprong, D.; Blommesteijn, G.; Hofland, I.; Hoebbers, F. J.; Blijweert, E.; Raleigh, J. A.; Semenza, G. L.; Varia, M. A.; Balm, A. J.; van Velthuisen, M. L. F.; Delaere, P.; Scot, R.; Begg, A. C. HIF-1A, pimonidazole, and iododeoxyuridine to estimate hypoxia and perfusion in human head-and-neck tumors. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54 (2002) Nr. 5, S. 1537-49

- [43] Kamlah, F.; Eul, B.; Lang, N.; Marsh, L.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Rose, F.; Hänze, J. Intravenous injection of siRNA directed against hypoxia-inducible factors prolongs survival in a Lewis lung carcinoma cancer model. In: *Cancer Gene Therapy* (2008) S. 1-11
- [44] Kamlah, F. In vivo siRNA-Transfektion der Lunge und des Bronchialkarzinoms zur Analyse der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in der Tumورprogression. (2007) S. XI, 172
- [45] Koukourakis, M. I.; Giatromanolaki, A.; Sivridis, E.; Simopoulos, C.; Turley, H.; Talks, K.; Gatter, K.; Harris, A. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53 (2002) Nr. 5, S. 1192-202
- [46] Kreuzer, M.; Jöckel, K.; Wichmann, H.; Straif, K. Rauchen, Passivrauchen und Krebserkrankungen: Aktuelle Studien aus Deutschland und ihr Beitrag zur IARC-Monographie. In: *Der Onkologe* 12 (2006) Nr. 11, S. 1094-1105
- [47] Kreuzer, M.; Kreienbrock, L.; Gerken, M.; Heinrich, J.; Bruske-Hohlfeld, I.; Müller, K. M.; Wichmann, H. E. Risk factors for lung cancer in young adults. In: *Am J Epidemiol* 147 (1998) Nr. 11, S. 1028-37
- [48] Krishnamachary, B.; Zagzag, D.; Nagasawa, H.; Rainey, K.; Okuyama, H.; Baek, J.; Semenza, G. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. In: *Cancer Res* 66 (2006) Nr. 5, S. 2725-31
- [49] Lee, C. -; Cheng, W. -; Chang, M. -; Su, Y. -; Chen, C. -; Hsieh, F. - Hypoxia-induced apoptosis in endothelial cells and embryonic stem cells. In: *Apoptosis* 10 (2005) Nr. 4, S. 887-94
- [50] Leuschner, P. J. F.; Ameres, S. L.; Kueng, S.; Martinez, J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. In: *EMBO Rep* 7 (2006) Nr. 3, S. 314-20
- [51] Liao, D.; Johnson, R. S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. In: *Cancer Metastasis Rev* 26 (2007) Nr. 2, S. 281-90
- [52] Lieber, M.; Smith, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W.; Todaro, G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. In: *Int J Cancer* 17 (1976) Nr. 1, S. 62-70
- [53] Lin, X.; Zhang, F.; Bradbury, C. M.; Kaushal, A.; Li, L.; Spitz, D. R.; Aft, R. L.; Gius, D. 2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. In: *Cancer Res* 63 (2003) Nr. 12, S. 3413-7
- [54] Little, J. B. Delayed initiation of DNA synthesis in irradiated human diploid cells. In: *Nature* 218 (1968) Nr. 5146, S. 1064-5
- [55] M. Wolf, U. N. Therapie des fortgeschrittenen Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms. In: *Der Onkologe* (2002) Nr. 5, S. 471-486
- [56] Maity, A.; McKenna, W. G.; Muschel, R. J. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. In: *Radiother Oncol* 31 (1994) Nr. 1, S. 1-13

- [57] Matranga, C.; Tomari, Y.; Shin, C.; Bartel, D. P.; Zamore, P. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. In: *Cell* 123 (2005) Nr. 4, S. 607-20
- [58] Milas, L.; Mason, K.; Hunter, N.; Petersen, S.; Yamakawa, M.; Ang, K.; Mendelsohn, J.; Fan, Z. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody. In: *Clin Cancer Res* 6 (2000) Nr. 2, S. 701-8
- [59] Moeller, B.; Cao, Y.; Li, C. Y.; Dewhirst, M. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. In: *Cancer Cell* 5 (2004) Nr. 5, S. 429-41
- [60] Moeller, B.; Cao, Y.; Vujaskovic, Z.; Li, C.; Haroon, Z.; Dewhirst, M. The relationship between hypoxia and angiogenesis. In: *Semin Radiat Oncol* 14 (2004) Nr. 3, S. 215-21
- [61] Moeller, B.; Dewhirst, M. Raising the bar: how HIF-1 helps determine tumor radiosensitivity. In: *Cell Cycle* 3 (2004) Nr. 9, S. 1107-10
- [62] Moeller, B.; Dreher, M. R.; Rabbani, Z.; Schroeder, T.; Cao, Y.; Li, C. Y.; Dewhirst, M. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. In: *Cancer Cell* 8 (2005) Nr. 2, S. 99-110
- [63] Moulder, J. E.; Rockwell, S. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. In: *Cancer Metastasis Rev* 5 (1987) Nr. 4, S. 313-41
- [64] Osann, K. E. Lung cancer in women: the importance of smoking, family history of cancer, and medical history of respiratory disease. In: *Cancer Res* 51 (1991) Nr. 18, S. 4893-7
- [65] Petros, A. M.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. In: *Biochim Biophys Acta* 1644 (2004) Nr. 2-3, S. 83-94
- [66] Qing, G.; Simon, M. C. Hypoxia inducible factor-2 α : a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. In: *Curr Opin Genet Dev* 19 (2009) Nr. 1, S. 60-6
- [67] Quintero, M.; Brennan, P. A.; Thomas, G. J.; Moncada, S. Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer: role of free radical formation. In: *Cancer Res* 66 (2006) Nr. 2, S. 770-4
- [68] Rand, T. A.; Petersen, S.; Du, F.; Wang, X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. In: *Cell* 123 (2005) Nr. 4, S. 621-9
- [69] Rankin, E. B.; Biju, M. P.; Liu, Q.; Unger, T. L.; Rha, J.; Johnson, R. S.; Simon, M. C.; Keith, B.; Haase, V. H. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. In: *J Clin Invest* 117 (2007) Nr. 4, S. 1068-77
- [70] Ratcliffe, P. J. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia?. In: *J Clin Invest* 117 (2007) Nr. 4, S. 862-5
- [71] Raval, R. R.; Lau, K. W.; Tran, M. G. B.; Sowter, H. M.; Mandriota, S. J.; Li, J.; Pugh, C. W.; Maxwell, P. H.; Harris, A. L.; Ratcliffe, P. J. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. In: *Mol Cell Biol* 25 (2005) Nr. 13, S. 5675-86
- [72] Ries, L.; Eisner, M.; Kosary, C.; Hankey, B.; Miller, B.; Clegg, L.; Mariotto, A.; Feuer, E.; Edwards, B.: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002. URL http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/index.html.

- [73] Riesterer, O.; Honer, M.; Jochum, W.; Oehler, C.; Ametamey, S.; Pruschy, M. Ionizing radiation antagonizes tumor hypoxia induced by antiangiogenic treatment. In: Clin Cancer Res 12 (2006) Nr. 11 Pt 1, S. 3518-24
- [74] Savai, R.; Schermuly, R. T.; Voswinckel, R.; Renigunta, A.; Reichmann, B.; Eul, B.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Rose, F.; Hanze, J. HIF-1 α attenuates tumor growth in spite of augmented vascularization in an A549 adenocarcinoma mouse model. In: Int J Oncol 27 (2005) Nr. 2, S. 393-400
- [75] Semenza, G. L.; Artemov, D.; Bedi, A.; Bhujwalla, Z.; Chiles, K.; Feldser, D.; Laughner, E.; Ravi, R.; Simons, J.; Taghavi, P.; Zhong, H. 'The metabolism of tumours': 70 years later. In: Novartis Found Symp 240 (2001) S. 251-60; discussion 260-4
- [76] Semenza, G. L.; Nejfelt, M. K.; Chi, S. M.; Antonarakis, S. E. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. In: Proc Natl Acad Sci U S A 88 (1991) Nr. 13, S. 5680-4
- [77] Semenza, G. L.; Roth, P. H.; Fang, H. M.; Wang, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. In: J Biol Chem 269 (1994) Nr. 38, S. 23757-63
- [78] Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. In: Nat Rev Cancer 3 (2003) Nr. 10, S. 721-32
- [79] Smith, K.; Gunaratnam, L.; Morley, M.; Franovic, A.; Mekhail, K.; Lee, S. Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. In: Cancer Res 65 (2005) Nr. 12, S. 5221-30
- [80] Sowter, H. M.; Raval, R. R.; Moore, J. W.; Ratcliffe, P. J.; Harris, A. L. Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1 α versus Hif-2 α in regulation of the transcriptional response to hypoxia. In: Cancer Res 63 (2003) Nr. 19, S. 6130-4
- [81] Tobey, R. A. Different drugs arrest cells at a number of distinct stages in G2. In: Nature 254 (1975) Nr. 5497, S. 245-7
- [82] Tomari, Y.; Zamore, P. D. Perspective: machines for RNAi. In: Genes Dev 19 (2005) Nr. 5, S. 517-29
- [83] Toulany, M.; Dittmann, K.; Baumann, M.; Rodemann, H. P. Radiosensitization of Ras-mutated human tumor cells in vitro by the specific EGF receptor antagonist BIBX1382BS. In: Radiother Oncol 74 (2005) Nr. 2, S. 117-29
- [84] Toulany, M.; Dittmann, K.; Kruger, M.; Baumann, M.; Rodemann, H. P. Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway. In: Radiother Oncol 76 (2005) Nr. 2, S. 143-50
- [85] Travis, W. D.: Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press, 2004. - 9789283224181
- [86] Travis, W. D.; Travis, L. B.; Devesa, S. S. Lung cancer. In: Cancer 75 (1995) Nr. 1 Suppl, S. 191-202
- [87] Vaupel, P.; Mayer, A.; Hockel, M. Tumor hypoxia and malignant progression. In: Methods Enzymol 381 (2004) S. 335-54

- [88] Vaupel, P.; Mayer, A. Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. In: *Transfus Clin Biol* 12 (2005) Nr. 1, S. 5-10
- [89] Vaupel, P.; Mayer, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. In: *Cancer Metastasis Rev* 26 (2007) Nr. 2, S. 225-39
- [89] Vaupel, P.; Mayer, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. In: *Cancer Metastasis Rev* 26 (2007) Nr. 2, S. 225-39
- [91] Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. In: *Oncologist* 9 Suppl 5 (2004) S. 10-7
- [92] Volm, M.; Koomagi, R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. In: *Anticancer Res* 20 (2000) Nr. 3A, S. 1527-33
- [93] Walenta, S.; Mueller-Klieser, W. F. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. In: *Semin Radiat Oncol* 14 (2004) Nr. 3, S. 267-74
- [94] Wang, W.; Chen, Z.; Li, R.; Li, D.; Duan, Y.; Cao, Z. Enhanced efficacy of radiation-induced gene therapy in mice bearing lung adenocarcinoma xenografts using hypoxia responsive elements. In: *Cancer Sci* 96 (2005) Nr. 12, S. 918-24
- [95] Yuan, Y.; Pei, Y.; Chen, H.; Tuschl, T.; Patel, D. J. A potential protein-RNA recognition event along the RISC-loading pathway from the structure of *A. aeolicus* Argonaute with externally bound siRNA. In: *Structure* 14 (2006) Nr. 10, S. 1557-65
- [96] Zhou, J.; Schmid, T.; Schnitzer, S.; Brune, B. Tumor hypoxia and cancer progression. In: *Cancer Lett* 237 (2006) Nr. 1, S. 10-21

7.2. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES AUFBAUS VON HIF-1ALPHA, HIF-2ALPHA UND ARNT [23]	14
ABBILDUNG 2: REGULATION HYPOXIE-INDUZIERBARER FAKTOREN [23]	15
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MECHANISMUS DER STRAHLENINDUZIERTEN REGULATION VON HIF-1ALPHA [20]	17
ABBILDUNG 4: DARSTELLUNG DER LAGERUNG EINES VERSUCHSTIERS ZUR PERKUTANEN BESTRAHLUNG	27
ABBILDUNG 5: BEISPIELHAFTE DARSTELLUNG EINER WACHSTUMSVERZÖGERUNG EINES BESTRAHLTEN TUMORS IM VERGLEICH ZU EINEM UNBEHANDELTEN KONTROLLTUMOR [36]	30
ABBILDUNG 6: TUMORVOLUMEN DER A549-TUMOREN NACH BESTRAHLUNG (→) MIT 1 X 2,0 GY	38
ABBILDUNG 7: TUMORVOLUMEN VON A549 TUMOREN NACH FRAKTIONIERTER BESTRAHLUNG (→) MIT 6 X 1,8 GY	40
ABBILDUNG 8: GESAMTTUMORFLÄCHE UND FLÄCHE DES VITALEN TUMORGEWEBES NACH BESTRAHLUNG	41
ABBILDUNG 9: NEKROTISCHE TUMORFLÄCHE UND VERHÄLTNIS ZWISCHEN VITALEN TUMORAREALEN UND NEKROTISCHE TUMORAREALEN BEI BESTRAHLTEN UND NICHT BESTRAHLTEN	43
ABBILDUNG 10: REPRÄSENTATIVE IMMUNHISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER KERNFÄRBUNG MITTELS DAPI BEI SUBKUTAN LIEGENDEN A549 TUMOREN	44
ABBILDUNG 11: REPRÄSENTATIVE IMMUNHISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER APOPTOSE MITTELS CASPASE-3-FÄRBUNG BEI SUBKUTAN TRANSPLANTierten A549-TUMOREN	45
ABBILDUNG 12: VERHÄLTNIS DER SIGNALSTÄRKE VON CASPASE-3 UND DER DAPI-FÄRBUNG IN NICHT BESTRAHLTEN UND BESTRAHLTEN A549-TUMOREN ...	46
ABBILDUNG 13: REPRÄSENTATIVE IMMUNHISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER ANGIOGENESE MITTELS CD31 BEI A549-TUMOREN	47
ABBILDUNG 14: VERHÄLTNIS DER SIGNALSTÄRKE VON CD31 ZUR DAPI-FÄRBUNG IN NICHT BESTRAHLTEN UND BESTRAHLTEN A549-TUMOREN	48
ABBILDUNG 15: REPRÄSENTATIVE IMMUNHISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER PROLIFERATION MITTELS KI67 BEI A549-TUMOREN	49
ABBILDUNG 16: VERHÄLTNIS DER SIGNALSTÄRKE VON KI67 UND DER DAPI-FÄRBUNG IN NICHT BESTRAHLTEN UND BESTRAHLTEN A549-TUMOREN	50

ABBILDUNG 17: MRT PERFUSIONSMESSUNG DER ANFLUTUNG DES KONTRASTMITTELS IM ZENTRUM BZW. IN DER PERIPHERIE DER A549 TUMOREN	51
ABBILDUNG 18: WACHSTUMSVERHALTEN VON A549-TUMOREN NACH BESTRAHLUNG (→) MIT UNTERSCHIEDLICHER GESAMTDOSIS.....	53
ABBILDUNG 19: WACHSTUMSVERZÖGERUNG VON A549-TUMOREN NACH BESTRAHLUNG MIT UNTERSCHIEDLICHER GESAMTDOSIS	54
ABBILDUNG 20: WACHSTUMSVERHALTEN VON A549-TUMOREN NACH INJEKTION VON SIRNA-RANDOM ODER SIRNA GEGEN HIF-1ALPHA ODER HIF-2ALPHA.....	57
ABBILDUNG 21: WACHSTUMSVERZÖGERUNG VON A549-TUMOREN NACH INJEKTION VON SIRNA-RANDOM ODER SIRNA GEGEN HIF-1ALPHA ODER HIF-2ALPHA	58
ABBILDUNG 22: ZEITPUNKTE DER SIRNA-INJEKTION UND DER BESTRAHLUNGEN....	61
ABBILDUNG 23: WACHSTUMSVERHALTEN VON A549-TUMOREN NACH SIRNA-INJEKTION GEGEN HIF-1ALPHA ODER HIF-2ALPHA MIT NACHFOLGENDER BESTRAHLUNG	62
ABBILDUNG 24: WACHSTUMSVERZÖGERUNG VON A549-TUMOREN NACH SIRNA-INJEKTION GEGEN HIF-1ALPHA ODER HIF-2ALPHA MIT NACHFOLGENDER BESTRAHLUNG	63

7.3. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: STADIENEINTEILUNG DES NSCLC (MODIFIZIERT NACH [19]).....	11
TABELLE 2: SEQUENZEN DER VERWENDETEN SIRNAS (BIOMERS, ULM)	24
TABELLE 3: GRUPPENEINTEILUNG (N=5) DES VERSUCHS ZUR PRÜFUNG DER BESTRAHLUNGSWIRKUNG AUF SUBKUTANE (S.C.) TUMOREN IM MAUSMODELL NACH BESTRAHLUNG MIT 1 X 2,0 GY.....	38
TABELLE 4: GRUPPENEINTEILUNG (N=5) DES VERSUCHS ZUR PRÜFUNG DER BESTRAHLUNG MIT 6 X 1,8 GY AUF TUMOREN IM MAUSMODELL.....	39
TABELLE 5: GRUPPENEINTEILUNG (N=5) ZUR ÜBERPRÜFUNG DER WACHSTUMSVERZÖGERUNG VON A549-TUMOREN IM MAUSMODELL NACH EINER FRAKTIONIERTEN BESTRAHLUNG MIT UNTERSCHIEDLICHEN GESAMTDOSEN.....	52
TABELLE 6: ERRECHNETE ABSOLUTE WACHSTUMSVERZÖGERUNG VON A549-TUMOREN NACH BESTRAHLUNG MIT UNTERSCHIEDLICHER GESAMTDOSIS	55
TABELLE 7: GRUPPENEINTEILUNG ZUR ÜBERPRÜFUNG DER WACHSTUMSVERZÖGERUNG VON A549 TUMOREN NACH INJEKTION VON SIRNA GEGEN HIF-1ALPHA (N=5) ODER HIF 2ALPHA (N=5) SOWIE UNSPEZIFISCHER SIRNA RANDOM (N=5).....	56
TABELLE 8: ABSOLUTE WACHSTUMSVERZÖGERUNG VON A549-TUMOREN NACH INJEKTION VON SIRNA-RANDOM ODER SIRNA GEGEN HIF-1ALPHA ODER HIF-2ALPHA GEGENÜBER DER KONTROLLGRUPPE.	59
TABELLE 9: GRUPPENEINTEILUNG (N=6) ZUR ÜBERPRÜFUNG DER WACHSTUMSVERZÖGERUNG VON A549-TUMOREN IM MAUSMODELL NACH INJEKTION VON SIRNA GEGEN HIF-1ALPHA ODER HIF-2ALPHA ODER SIRNA-RANDOM UND BESTRAHLUNG MIT JEWEILS 2 X 1,5 GY	60
TABELLE 10: WACHSTUMSVERZÖGERUNG NACH INJEKTION VON SPEZIFISCHER SIRNA GEGEN HIF-1ALPHA ODER HIF-2ALPHA IN KOMBINATION MIT PERKUTANER BESTRAHLUNG	64

7.4. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A549	humanes alveolarepitheliales Adenokarzinom
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adenosintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Aktenzeichen
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
d	Tage
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED50	Effektivdosis 50%
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EHD	Einzelherddosis
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GHD	Gesamtherddosis
Gy	Gray
h	Stunde
HIF	Hypoxie-induzierbare Faktoren
HIF-1alpha	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 alpha
HIF-2alpha	Hypoxie-induzierbarer Faktoren 2 alpha
HRE	Hypoxie-responsive Element
l	Liter
m	Meter
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHg	mm Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
n.s.	nicht signifikant
N/P- Verhältnis	Stickstoff/Phosphat-Verhältnis
NSCLC	nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom
p.a.	posterior-anterior
p53	Tumor-Suppressor-Protein 53

PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
pre-mRNA	pre messenger RNA
pVHL	von-Hippel-Lindau-Protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
Rnase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
TGF-alpha	Transforming growth factor alpha
TNM	Tumor Node Metastases
UTR	3`untranslatierte Region
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
z. B.	zum Beispiel

7.5. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte:

Geräte für die Zellkultur	
Brutschrank	IR 1500 Automatic CO ₂ Incubator, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
Mikroskop	Olympus Mikroskop, Gerätetyp JMT-2, inverses Forschungsmikroskop, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Neubauerzählkammer	Haemocytometer, Neubauer-Kammer, Optik-Labor, Friedrichshofen; Deckgläser für das Haemocytometer, optisch plan geschliffen, 20 x 26 mm, Menzel GmbH & Co KG; Braunschweig
Rüttler	IKA-VIBRAX-VXR elektronik, Jauke/Kunkel Labortechnik, Staufen
Sterilbank	Laminar air flow, Typ BSB 4A, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
Wasserbad	Köttermann-Labortechnik, Uetze-Hänigsen
Zentrifuge	Hettrich Rotanta/RP, Kühlenzentrifuge mit Schwingbecherrotor, Tuttlingen

Geräte für die Tierversuche	
Messschieber	Modellnr.: CD-15 CP, Mitutoyo, U. K. Ltd., England
Wärmeunterlage	ThermoLux-Wärmeunterlage, Firma Witte/Sutor GmbH

Geräte für histologische Untersuchungen	
Bildbearbeitungsprogramm	Q-Win, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Digitalkamera	DC 300 FX Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Filtersystemen	380 λ - 420 λ, 420 λ - 515 λ und 500 λ - 590 λ, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMLA Q550/W Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Kryostat	Leica CM1850 UV-Kryostat, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
pH-Meters	digitales pH-Meter, Firma Schott AG, Mainz
Wasseraufbereitungsanlage	Purification System, Millipore, Eschborn
Milli-Q Water	

Verbrauchsmaterialien:

Labormaterialien für die Zellkultur	
1 ml Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
15ml Falcons	BD Falcon, Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
50 ml Falcons	BD Falcon, Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Bottle-top Filter, Gewinde 33 mm und 45 mm 0,22 µm, 150 ml	Millipore Carrigtwohill, Co., Cork, Ireland
Cup	Safe-lock Tubes, farblos, 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg
Feinnadel	26 Gx½" BD Microlance TM 3, Becton Dickson S. A., Drogheda, Ireland
Kryoröhrchen	Kryoröhrchen, Greiner Bio-One, Nürtingen
Kulturschale	d=100 mm, Greiner Bio-One, Nürtingen
Pasteurpipetten, 5ml, 10 ml, 50 ml	Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Spritzenaufsatz, Millex® GP 0,22 µm Filter	Millipore Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland
Zellkulturschalen, 100 mm & T75	Greiner Bio-One, Nürtingen

Labormaterialien für die Tierversuche	
Käfigstreu	Altromin Tiereinstreu-Granulat, Altromin GmbH + Co. KG, Lage-Lippe
Präparationspinzette und Schere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Tierfutter	Alleinfuttermittel für Ratten- und Mäusehaltung, Ssniff R/M-H, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Tierkäfige	Polycarbonatkäfig Makrolon, TypII L, Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld

Labormaterialien für die histologischen Untersuchungen	
Deckgläschen	24 x 50 mm, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen
Einbettgefäß	Tissue Tek Cryomold Intermediate, Sakura, Tokyo, Japan
Färbekammer	Färbegestell für 10 Objektträger, Glaskasten mit Deckel, Glaswerk Wertheim, Wertheim
Mikrotom-Messer	Mikrotom Messer, S-35, Feather, PFM Produkte für die Medizin AG, Köln
Objektträger	Super Frost Plus Objektträger, 25 x 75 x 1 mm, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen

Lösungen für Zellkulturexperimente

1% Gentamycin/ Penicillin G	lyophilisiert, steril, Gibco, Karlsruhe
1% L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
1% nicht essentielle Aminosäuren	MEM NON-essential Amino Acids, Gibco, Karlsruhe
1% Vitamin	MEM Vitamin solution, Gibco, Karlsruhe
86% DMEM-F12	DMEM : F-12 (1:1) 500 ml, -L-Glutamin, Gibco, Karlsruhe
Aqua injectabile	Baxter Deutschland GmbH, Unter-Schleißheim
DMSO	Dimethyl sulfoxide minimum 99,5%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FCS	fötales Kälberserum, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glukoselösung	Glukose 10 Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Hepes	Hepes, Gewebekulturpuffer, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulphonsäure, Roth GmbH, Karlsruhe
jetPEI™	in vivo-jetPEI™, cationic polymer transfection Reagent, BIOMOL GmbH, Hamburg
PBS-Lösung	DPBS, Pan Biotech GmbH, Aidenbach
steriler Kochsalzlösung	isotonische Natriumchlorid-Lösung, Delta Select, Pfullingen
Trypsin	Trypsin-EDTA-Lösung, Gibco, Karlsruhe

Lösungen für Tierversuche

Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Dexpanthenol, Firma Roche
Gadolinium	Bayer Schering Pharma, Leverkusen
Ketavet	Ketaminhydrochlorid, 100 mg/ml, Pharmacia GmbH, Erlangen
NaCl	Delta Select, Pfullingen
Rompun	Xylazinhydrochlorid 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen

Lösungen für histologische Untersuchungen

BSA	Bovines Serum Albumin, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Caspase-3 Antikörper	rab-anti-human Caspase-3, 1:100, Anti-Active Caspase-3 pAb Promega Corporation, Madison, WI 53711, 5399, USA
CD31 Antikörper	rat-anti-mouse CD31, PECAM-1, 1:100, 1 ml (15,625 µg/µl), Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
DAPI-Lösung	D9564 DAPI, dilactate; 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dilactate; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fixationssubstanz	Tissue Tek O. C. T. Compound Sakura, Tokyo, Japan
Fluoreszent- Mounting-Medium	Dako Cytomation GmbH, Hamburg) beschichtet und mit Deckgläschen (24 x 50 mm, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen
Ki67 Antikörper	rab-anti-human Ki67, 1:100, Rabbit polyclonal to Ki67-Proliferationsmarker (ab 833), Abcam Ltd.332 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FW, UK
Methanol und Aceton	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz und Aceton, Merck KGaA, Darmstadt
Triton	Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

8. Curriculum Vitae

(Seite 96 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung)

Kongressbeiträge

RIEDMAIER, O.; EUL, B.; KAMLAH, F.; GRUND, S.; ENGENHART-CABILLIC, R.; GRIMMINGER, F.; HÄNZE J.; ROSE, F.: Entwicklung therapeutischer Ansätze durch Modulation Hypoxie-abhängiger Signalkaskaden - Implikationen für die Strahlentherapie? Dresden: DEGRO (2006)

EUL, B.; RIEDMAIER, O.; GRUND, S.; KAMLAH, F.; ENGENHARDT-CABILLIC, R.; GRIMMINGER, F.; HÄNZE, J.; ROSE, F.: Hypoxia-inducible-factors (HIF-1a and HIF-2a) affect radiation resistance in the human lung adenocarcinoma cell line A549. Frankfurt: AEK, 2007. (2007)

RIEDMAIER, O.; GRUND, S.; KAMLAH, F.; ENGENHARDT-CABILLIC, R.; GRIMMINGER, F.; HÄNZE, J.; ROSE, F.: Die Rolle der Hypoxie-induzierbaren-Faktoren in der Strahlentherapieresistenz von Adenokarzinomzellen der Lunge. Wiesbaden: DGIM (2007)

GRUND, S.; EUL, B.; KAMLAH, F.; GRIMMINGER, F.; HÄNZE, J.; ROSE, F.; ENGENHART-CABILLIC, R.: Hemmung des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1 verzögert das Wachstum in humanen Adenokarzinomzellen der Lunge (A549) nach Photonenbestrahlung in vivo. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 185 (2009) Nr. Sonderheft 1, S. 146

HENZEL, M.; GRUND, S.; ELVERMANN, A.; UBRICH, F.; ENGENHART-CABILLIC, R.: Linac-based Radiosurgery of Trigeminal Pain. Clinical Outcome and Side Effects. Wiesbaden: DEGRO, (2011)

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Damen/Herren in Gießen:

Herr Prof. Dr. Bauer
Frau Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic
Frau Prof. Dr. Glanz
Herr Prof. Dr. Grimminger
Herr Prof. Dr. Hempelmann
Herr Prof. Dr. med. Kaps
Herr Prof. Dr. Dr. Katz
Herr Prof. Dr. Padberg
Herr Prof. Dr. Rau
Herr Prof. Dr. Reiter
Herr Prof. Dr. Seeger
Herr Prof. Dr. Stürz
Herr Prof. Dr. Tillmanns
Herr Prof. Dr. Weidner

Damen/Herren in Marburg:

Frau Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic

10. Danksagung

Ich danke Frau Professor Dr. R. Engenhardt-Cabillic für die Betreuung, Anregungen, konstruktive Auseinandersetzung, hilfreiche Unterstützung und kritische Beurteilung sowie für die Möglichkeit der Nutzung der Einrichtung.

Für die praktische Einarbeitung und Betreuung im Labor möchte ich Frau Dr. F. Kamlah und Frau G. Dahlem danken.

Ganz besonders danke ich Frau PD Dr. A. Wittig für die Übernahme der Korrektur meiner Arbeit.

Außerdem danke ich den gesamten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. F. Rose.

Ein besonderes Dankeschön an Frau A. Moritz und Herrn B. Keil für die Hilfestellung.

Mein Dank gilt meinen Geschwistern Hendrik und Gerald und deren Familien. Darüber hinaus möchte ich ganz besonders Frau Anke Kruchten für die Unterstützung in der Zeit danken.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, Renate und Neithard Grund, für die stetige Unterstützung, Aufmunterung, die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit.

11. Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Prüfung der HIF-1alpha induzierten Strahlenresistenzsteigerung bei humanen Adenokarzinomzellen der Lunge im Xenograftmodell“ in der Klinik für Strahlentherapie unter Leitung von Frau Professor Doktor R. Engenhardt-Cabillic mit Unterstützung durch Herrn Professor Doktor F. Rose ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.